

GUSTAVO HENRIQUE COUTO

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA LIPASE ISOLADA DE UMA
BIBLIOTECA METAGENÔMICA DO SOLO DE MANGUE DO PONTAL DO
SUL – PR**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a obtenção
do título de Doutor em Ciências –Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

CURITIBA 2009

*Aos meus pais Lutero e Marília Couto pelo
investimento na minha educação e apoio
em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos Professores Fábio de Oliveira Pedrosa e Emanuel Maltempi de Souza pelas orientações, ensinamentos e apoio durante todo esse período.

Ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio e seus professores, que sempre estiveram dispostos a ajudar, participaram da minha formação e propiciaram um ambiente agradável de trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, coordenada nessa fase pela Profa. Leda Satie Chubatsu e atualmente pelo Prof. Miguel Nosedá, por todo o apoio prestado. A secretária do Curso de Pós-Graduação Ciências-Bioquímica Marilza Lamour, pelos favores prestados.

Ao Grupo de Metagenômica e Biodiversidade, representado pelos professores Fábio de Oliveira Pedrosa, Emanuel Maltempi de Souza, Leda Satie Chubatsu, Leonardo Magalhães Cruz e colegas Arnaldo Glogauer, Helisson Faoro, Marcelo Muller dos Santos, Giovani Pisa, Rafael Mazer Etto, Rafael Ioris, Giovana de Souza Magnani, pelas discussões e ajuda constante no trabalho diário no laboratório.

À funcionária técnica do núcleo Roseli Prado pela dedicação constante, amizade, e preparo de meios e materiais durante todo esse período. Ao técnico Valter Antonio de Baura pela dedicação, ajuda na coleta das amostras de solo e ajuda nas etapas de seqüenciamento. A secretária do núcleo, Dona Julieta Pie, pela amizade, conselhos e agradável companhia.

Ao Prof. Paulo da Cunha Lana pelo apoio na coleta em Pontal do Sul-PR, ao Prof. Luciano Huergo pelo auxílio na análise de espectrometria de massa.

Aos colegas atuais ou que nesse período passaram pelo laboratório 275, Juliana Inaba, Marcelo Assumpção, Ana Claudia Bonatto, Geraldo Picheth, Cyntia Picheth, Michele Torres, Márcia Heidemann, Gilson Ichikawa, Adriana Twerdchilib, Magda Portugal, Vânia Pankiewicz, Giovana Nunes, Liziane Brusamarello e Fábio Cordeiro pela amizade, convivência diária, favores e momentos de descontração.

Aos colegas dos demais laboratórios no Núcleo de Fixação de Nitrogênio, Carboidratos, Oxidações Biológicas e Fermentação pela convivência, momentos de descontração e amizade.

À banca examinadora composta pelos professores Leonardo Magalhães Cruz (UFPR), Carolina Weigert Galvão (UEPG), Humberto França Madeira (PUC-PR), Marcelo Müller dos Santos (UFPR) pela disponibilidade e correção desta tese.

Às agências financiadoras deste trabalho, CNPq/MCT, Fundação Araucária, Fundo Paraná de Ciência e Tecnologia, Instituto do Milênio/CNPq/PADCT e a CAPES pela bolsa de estudos.

À toda a minha família, principalmente meus pais, que desde o início investiram na minha formação e particularmente durante esse período me apoiaram e incentivaram em todos os momentos.

À Raquel Pazini, por ser minha parceira em todas as situações, pela compreensão, apoio, amor e companheirismo. Sou muito feliz de ter você ao meu lado.

Agradeço a Deus, por me dar saúde, pela minha família e pelos amigos que me cercam.

“Scientists may be able to make any molecule that they imagine on a computer, but Nature is an infinitely more ingenious and exciting chemist”

– Edward Hammond

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Estudos da biodiversidade bacteriana por métodos de independentes de cultivo.....	3
2.2 Metagenômica.....	5
2.2.1 Extração de DNA do solo.....	6
2.2.2 Construção da biblioteca metagenômica	10
2.2.3 Métodos de triagem	13
2.3 Enzimas lipolíticas.....	15
2.3.1 Definição e estrutura.....	15
2.3.2 Classificação das lipases e esterases	19
2.3.3 Lipases na biotecnologia	19
2.4 Manguezais.....	20
3. JUSTIFICATIVA	23
4. OBJETIVO GERAL	24
4.1 Objetivos específicos	24
5.MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1 Estirpes e plasmídeos	25
5.2 Meios de Cultivo para <i>E. coli</i>	27
5.3 Antibióticos.....	28
5.4 Localização e coleta das amostras.....	29
5.5 Análise granulométrica e de matéria orgânica do solo.....	30
5.6 Extração de DNA do solo.....	30

5.7 Construção da biblioteca metagenômica.....	32
5.8 Triagem da biblioteca metagenômica.....	34
5.8.1 Triagem para atividade lipolítica.....	34
5.8.2 Triagem para atividade protease.....	34
5.8.3 Triagem para atividade amilase	35
5.8.4 Triagem para atividade carboximetilcelulase	35
5.8.5 Triagem para atividade celulase.....	36
5.9 Construção da biblioteca secundária e triagem para atividade de lipase	36
5.10 Minipreparação de plasmídeos	37
5.11 Preparo das células eletrocompetentes	38
5.12 Transformação por eletroporação	38
5.13 Eletroforese de DNA	39
5.14 Purificação de DNA do gel de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) 40	
5.15 Sequenciamento de DNA e construção dos mutantes LipA.....	40
5.16 Análise dos mutantes LipA.....	42
5.17 Amplificação por PCR.....	42
5.18 Clonagem do gene <i>lipA</i> no vetor de expressão pET28b+	43
5.19 Superexpressão da proteína LipA.....	44
5.20 Análise por espectrometria de massa	45
5.21 Ensaios de atividade lipolítica	46
5.21.1 Preparo do extrato de células.....	46
5.21.2 Determinação da atividade lipolítica por micro-ensaio colorimétrico	46
5.21.3 Curva de calibração e determinação da absorvidade molar (ϵ_L)...48	
5.21.4 Determinação da especificidade ao substrato.....	48
5.21.5 Determinação do pH ótimo.....	49
5.21.6 Determinação da temperatura ideal e termoestabilidade	50
5.22 Análise bioinformática	51
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
6.1 Isolamento de DNA de solo de mangue.....	52
6.2 Construção e triagem da biblioteca metagenômica	57
6.3 Análise da sequências do inserto do plasmídeo pUC-LipA.....	58

6.4 Superexpressão da proteína LipA em <i>E. coli</i>	72
6.5 Caracterização enzimática de LipA.....	75
7. CONCLUSÕES	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9. APÊNDICE.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da abordagem metagenômica.....	6
Figura 2. Reação enzimática de uma lipase catalisando a hidrólise ou a síntese de um triacilglicerol.....	16
Figura 3. Estrutura canônica do dobramento α/β -hidrolase de lipases.....	18
Figura 4. Imagem de satélite indicando a região de coleta do solo no litoral paranaense.....	29
Figura 5. Mapa do vetor pCC2FOS utilizado para a construção da biblioteca metagenômica.....	33
Figura 6. Reação de hidrólise do éster-pNP e formação do íon fenolato.....	47
Figura 7. Comparação do DNA extraído pelo método direto e indireto a partir do solo do mangue.....	53
Figura 8. Isolamento e purificação de DNA do solo de mangue.....	55
Figura 9. Ensaio de restrição com DNA purificado por eletroforese em gel de agarose.....	56
Figura 10. Expressão da lipase no clone pCC2-Lip em <i>E. coli</i> EPI300-T1R...58	
Figura 11. Triagem da sub-biblioteca metagenômica para atividade lipolítica..59	
Figura 12. Mapa físico do plasmídeo pUC-LipA expressando atividade lipolítica	61
Figura 13. Alinhamento da proteína LipA isolada do metagenoma do solo de mangue com sua proteína similar mais próxima no banco do NCBI	64
Figura 14. Alinhamento da proteína LipA isolada do metagenoma do solo de mangue com proteínas similares do banco do NCBI.....	65
Figura 15. Domínios conservados de LipA.....	68
Figura 16. Árvore filogenética de LipA do metagenoma do solo do mangue e outras lipases bacterianas.....	71
Figura 17. Identificação de LipA por espectrometria de massa MALDI-ToF....	73

Figura 18. Superexpressão da proteína LipA a partir plasmídeo pET28b-LipA em <i>E. coli</i> BL21(λDE3)pLysS.....	75
Figura 19. Especificidade ao substrato de LipA para ésteres de <i>p</i> -nitrofenila contendo cadeias de ácidos graxos de diferentes comprimentos.....	77
Figura 20. Efeito do pH na atividade de LipA.....	78
Figura 21. Efeito da temperatura na atividade (Δ) e estabilidade (●) de LipA ..	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de bibliotecas metagenômicas	12
Tabela 2. Bactérias e vetores utilizados.....	25
Tabela 3. Coeficientes de extinção molar do pNP em diferentes valores de pH no comprimento de onda a 348 nm.....	50
Tabela 4. Comparação da proteína LipA isolada do metagenoma do solo de mangue com suas proteínas homólogas.....	63
Tabela 5. Comparação entre LipA e lipases do gênero <i>Bacillus</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp^R: Ampicilina resistente

BLAST: *Basic Local Alignment Sequence Tool*

Cm^R : Cloramfenicol resistente

Da: Dalton

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Desoxiribonucleosídeos trifosfato

DO: Densidade ótica

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

GPS: *Global Positioning System* (Sistema de Posicionamento Global)

× g: Força Centrífuga Relativa

h: Hora

kb: Quilobase

KDa: Quilodalton

Km^R : Canamicina resistente

MALDI-ToF: Ionização/dessorção a laser assistida por matriz

min: Minutos

ORF: *Open reading frame* (Região Codificadora de Proteína)

pb: Pares de Bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Amplificação em Cadeia da Polimerase)

pNP: *p*-nitrofenol

pI: Ponto isoelétrico

PM: Peso molecular

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

seg: Segundos

Sm^R :Estreptomicina resistente

Tris: Tris hidroximetil-aminometano

V: Volume

RESUMO

Um novo gene que codifica uma lipase LipA com 283 aminoácidos e massa molecular de 32 KDa foi isolado e caracterizado a partir de uma biblioteca metagenômica construída a partir de solo de manguezal da costa sul do Brasil. LipA possui identidade de 52% com uma lipase de uma bactéria não-cultivada e baixa identidade ($\leq 31\%$) com lipases e esterases de microrganismos cultiváveis. Análise filogenética mostrou que LipA forma juntamente com sua proteína ortóloga um ramo único dentro da família I das lipases verdadeiras, formando assim uma nova subfamília de lipases. Determinação da atividade utilizando extrato bruto de células de *E. coli* com o gene *lipA* mostraram que a nova enzima tem preferência para ácidos graxos de cadeia carbônica curta ($C \leq 10$) e atividade máxima frente ao *p*-nitrofenol caprato (comprimento da cadeia carbônica: C10, 0,87 U/mg protein). O pH ótimo de LipA foi 8,0 e a enzima foi ativa numa faixa de temperatura de 20 a 35 °C, com atividade máxima frente ao *p*-nitrofenol butirato a 35 °C e pH 8,0.

ABSTRACT

A novel gene coding for a LipA-like lipase with 283 amino acids and molecular mass of 32 KDa was isolated and characterized from a metagenomic library from mangrove sediment of the southern Brazilian coast. LipA is 52 % identical to a lipase from uncultured bacterium and shared only low identities (≤ 31 %) with lipases/esterases from cultivable microorganisms. Phylogenetic analysis showed that LipA together with an orthologous protein from an uncultured bacterium form a unique branch within the family I of true lipases, therefore defining a new lipase subfamily. Activity determination using crude extracts of *E. coli* bearing the *lipA* gene revealed that the new enzyme has a preference for short size chain length fatty acids ($C \leq 10$) and maximum activity against *p*-nitrophenyl-caprate (chain length C10, 0.87 U mg protein⁻¹). The optimum pH of LipA was 8.0 and the enzyme was active over a range of temperature from 20 to 35°C with optimum activity against *p*-nitrophenyl-butyrate at 35°C and pH 8.0.

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia está baseada na procura e utilização de sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para responder às necessidades do homem. A biocatálise industrial em particular, tem se desenvolvido como um setor majoritário com aplicações em várias áreas, como no tratamento de resíduos tóxicos, na indústria de produtos de limpeza e alimentos, no processamento de materiais (algodão, couro, papel) entre outras transformações (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000).

O interesse na utilização das enzimas na indústria no lugar dos catalisadores químicos tem relação à sua biodegradabilidade e a crescente importância da questão ambiental em todos os segmentos. Além disso, enzimas podem catalisar reações em condições moderadas de temperatura e pressão, possuem alta especificidade, levando a uma menor acumulação de produtos indesejados (BULL; BUNCH; ROBINSON, 1999). No caso de processos realizados sob condições extremas, enzimas obtidas a partir de microrganismos extremófilos são capazes de agir sob alta temperatura ou na presença de meios não convencionais, como solventes orgânicos (FERRER *et al.*, 2007).

Os principais entraves para a substituição dos catalisadores químicos pelos biológicos são o elevado custo na produção das enzimas e a dificuldade de se adequar uma determinada enzima a uma condição reacional específica (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000). A descoberta de novas enzimas ou a modificação de enzimas existentes adaptadas às condições de reação são

questões importantes para melhor aproveitamento e ganho nos bioprocessos (MARRS; DELAGRAVE; MURPHY, 1999). Nesse contexto, os potenciais benefícios advindos da biodiversidade são incalculáveis (BULL; GOODFELLOW; SLATER, 1992).

Culturas puras de microrganismos têm sido empregadas há mais de 100 anos em bioprocessos, e mesmo com o passar do tempo sua importância econômica continua a ser enorme. As reações catalisadas por microrganismos possuem um elevado valor agregado na indústria química (€ 10 bilhões) sendo que nos próximos 10 anos estima-se que 60% do segmento da química fina sejam baseados nas conversões microbianas (LYND *et al.*, 2008).

A descoberta de que a maioria dos microrganismos não é prontamente cultivável utilizando meios convencionais de cultivo gerou uma grande mudança na microbiologia e no paradigma, que prediz que a existência de um microrganismo está condicionada ao seu cultivo (HANDELSMAN, 2004). Através do aparecimento da metagenômica surgiram novas perspectivas no campo da microbiologia, pois permitiu acessar o material genético da grande fração de microrganismos ainda não cultivável (HANDELSMAN, 2004). Essa inovação trouxe uma ampla possibilidade na descoberta de novos genes, enzimas e compostos químicos (LORENZ *et al.*, 2002). No presente trabalho, utilizamos a abordagem metagenômica para isolar e caracterizar uma lipase a partir de solo de mangue.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estudos da biodiversidade bacteriana por métodos independentes de cultivo

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética, estão presentes em praticamente todos os ambientes onde desempenham funções cruciais para a manutenção dos ecossistemas (WOESE, 1987). Esses microrganismos compreendem bactérias, arqueas, fungos, protozoários, algas e vírus, que são essenciais para os ciclos biogeoquímicos dos principais elementos da vida: carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e oxigênio. Por causa da intensa atividade biológica e grande capacidade de crescimento, os microrganismos marinhos são os maiores responsáveis pelo ciclo global de nutrientes (ARRIGO, 2005). A capacidade dos microrganismos de se adaptar, crescer e multiplicar mesmo em ambientes extremos (alta temperatura, alta salinidade ou alta pressão) deve-se a grande diversidade metabólica e fisiológica que adquiriram no decorrer do processo evolutivo (STEELE e STREIT, 2005).

Durante muito tempo a única forma de se estudar os microrganismos foi através do isolamento de culturas puras. O cultivo de bactérias serviu de base para construção do conhecimento da fisiologia e genética microbiana a partir da década de 60 até a metade da década de 80 (HANDELSMAN, 2004). Um dos trabalhos iniciais que focaram microrganismos ainda não-cultiváveis utilizou a extração direta de DNA do solo e a análise da reassociação das

moléculas simples fita de DNA, quantificada por espectrofotometria, como forma de medir a diversidade bacteriana no solo. (TORSVIK *et al.*, 1990). Os experimentos desse trabalho mostraram que a complexidade do DNA no solo era pelo menos 100 vezes maior daquela obtida através do isolamento das bactérias presentes na amostra de solo. Estudos posteriores mostraram que 1 g de solo ou sedimento pode conter até 10^{10} bactérias, com até 12.000 genomas diferentes, diversidade maior do que qualquer outro tipo de ambiente (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990). Alguns autores sugerem ainda que estas estimativas sejam subestimadas e que a comunidade bacteriana possa chegar a mais de 10^7 bactérias de 10^7 grupos taxonômicos (CURTIS; SLOAN, 2005).

Estudos sobre a biodiversidade de vários ambientes e principalmente de solos, mostram que apenas 0,1 a 1,0% das bactérias presentes no ambiente são cultiváveis utilizando métodos de cultivo tradicionais (TORSVIK; GOKSOYR; DAAE, 1990; AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). O avanço das técnicas baseadas no seqüenciamento do gene 16S rDNA e no isolamento de DNA do meio ambiente contribuíram para o estudo da diversidade e parentesco evolutivo dos microrganismos (OLSEN *et al.*, 1986; WOESE, 1987). A crescente caracterização dos procariotos e seu estudo taxonômico levaram a geração de um considerável volume de genes, proteínas e genomas nos bancos de dados públicos (LIESACK; STACKEBRANDT, 1992).

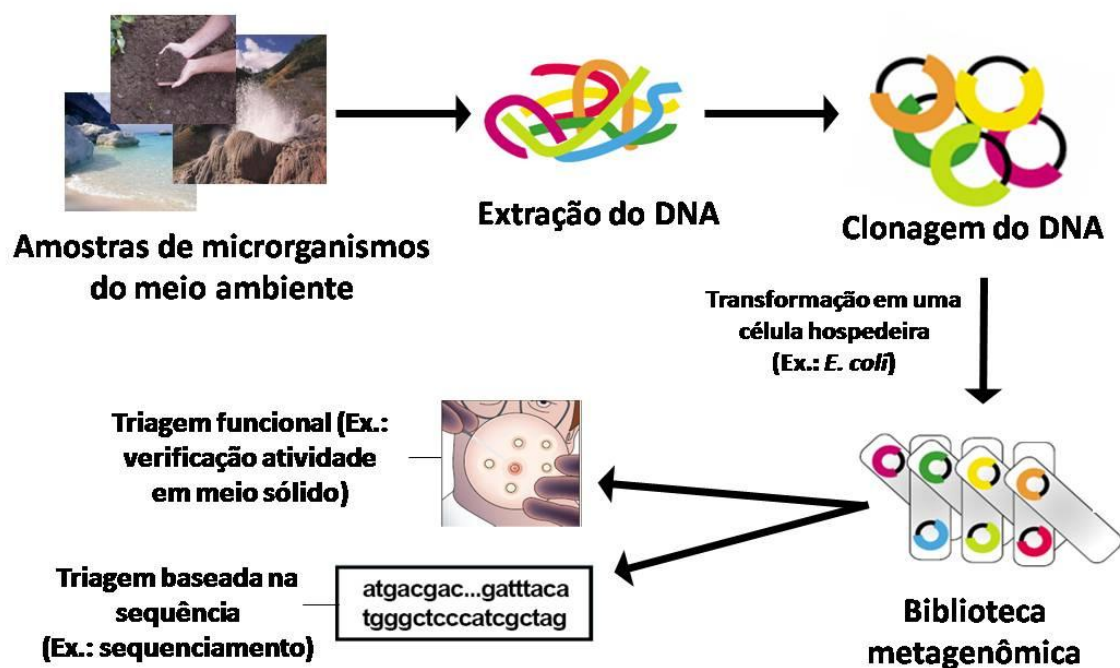
2.2 Metagenômica

Nos últimos anos, a metagenômica tem surgido como um método capaz de acessar a fisiologia e genética dos microrganismos ainda não cultiváveis e, portanto, uma alternativa viável para a descoberta de novas enzimas e vias metabólicas (HANDELSMAN, 2004). Várias definições para metagenômica surgiram deste então, dentre as quais podemos citar: “análise genômica de uma população de microrganismos” ou “análise estrutural e funcional de genomas microbianos coletivos presentes numa dada amostra ambiental” (HANDELSMAN, 2004; RIESENFELD; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004).

O conceito de clonar o DNA diretamente do meio ambiente foi inicialmente sugerido por Pace e colaboradores na metade da década de 80 (PACE *et al.*, 1985). A consolidação da abordagem metagenômica veio com publicações de trabalhos de construção de bibliotecas a partir de bactérias da água do mar (SCHMIDT; DELONG; PACE, 1991; STEIN *et al.*, 1996). O próximo avanço foi o isolamento de enzimas (celulases) de uma biblioteca metagenômica construída a partir de um consórcio de organismos de um digestor anaeróbico (HEALY *et al.*, 1995).

A análise metagenômica compreende as seguintes etapas: (a) isolamento de DNA de qualquer amostra ambiental, (b) clonagem do DNA em vetor apropriado, (c) transformação dos clones recombinantes em uma célula hospedeira, normalmente uma estirpe de *E. coli*, (d) triagem da biblioteca metagenômica, que pode ser baseada na função dos genes ou no seqüenciamento de DNA (Figura 1) (HANDELSMAN, 2004).

Figura 1. Etapas da abordagem metagenômica.



A análise metagenômica envolve 3 etapas: (a) isolamento de DNA de uma amostra ambiental, (b) clonagem do DNA em vetores e transformação dos clones em uma célula hospedeira, normalmente *E. coli*, (c) triagem funcional ou baseado na sequência dos clones da biblioteca.

2.2.1 Extração de DNA do solo

A estrutura e textura dos solos são determinadas na maior parte pelos seus constituintes minerais que, de acordo com o tamanho, são classificados como areia, silte e argila (ROBE *et al.*, 2003). Quanto ao componente matéria orgânica, sua origem é decorrente principalmente da decomposição de

resíduos de origem animal e vegetal, iniciada pela ação da mesofauna e posteriormente pelos microrganismos decompositores. Dentre todos os organismos que habitam o solo, as bactérias são os que estão em maior abundância, formando a maior parcela da biomassa do solo (HASSINK, 1993).

O solo é considerado um reservatório de diversidade genética microbiana, pois é um ambiente extremamente complexo e heterogêneo (CURTIS; SLOAN; SCANNELL, 2002). Tal complexidade é resultado da múltipla interação de características como textura e estrutura do solo, conteúdo de água, pH, variações climáticas e atividade biótica (CURTIS; SLOAN, 2004). Os microrganismos estão distribuídos em microhabitats no interior de micro-agregados ou superficialmente nas porosidades desses micro-agregados (EDGCOMB *et al.*, 1999).

Desde o início dos anos 80, quando Torsvik isolou DNA de amostras ambientais pela primeira vez para o estudo da ecologia microbiana, vários protocolos de extração de DNA têm sido desenvolvidos nessa área (TORSVIK, 1980). Nesses protocolos, dois métodos são normalmente utilizados para a extração de ácidos nucleicos do caso do solo. Um deles, chamado método direto, compreende a extração direta do DNA a partir da amostra após a lise *in situ* das células, que ocorre na presença do solo (OGRAM; SAYLER; BARKAY, 1987). O outro, denominado método indireto, primeiro separa as células das partículas do solo para que ocorra a lise (TORSVIK, 1980).

A comparação entre os dois métodos mostra que os métodos de extração direta possuem maior rendimento e são menos tendenciosos quanto à abrangência de espécies recuperadas. Por outro lado os métodos de extração

indiretos produzem DNA menos fragmentado, com alta massa molecular, sem contaminação de DNA eucarioto, pois separa especificamente as comunidades bacterianas antes da etapa de lise; e menos contaminado por compostos orgânicos (ROBE *et al.*, 2003).

Fora a etapa de separação das células do solo existente no método indireto, nas duas metodologias quatro etapas básicas são identificadas: (a) lise celular, (b) extração, (c) concentração e (d) purificação dos ácidos nucléicos (ROBE *et al.*, 2003). A lise celular pode ser realizada, de forma independente ou combinada, por três maneiras diferentes: lise mecânica, enzimática e química. A lise mecânica, que além de lisar a célula também destrói a estrutura do solo, tem maior acessibilidade à comunidade bacteriana dentro dos micro-agregados. Neste caso são utilizados processos abrasivos como homogeneização na presença de pérolas de vidro ou maceração com nitrogênio líquido (OGRAM; SAYLER; BARKAY, 1987).

A lise enzimática resulta na digestão enzimática da parede celular das bactérias, na qual se utiliza principalmente lisozima, proteinase K ou E (ZHOU; BRUNS; TIEDJE, 1996). Na lise química o SDS é o detergente mais comumente utilizado, mas o sarcosil e isotiocianato de guanidina também são utilizados para causar o rompimento da parede celular ou membrana plasmática (HOLBEN *et al.*, 1988; ZHOU; BRUNS; TIEDJE, 1996). A extração dos ácidos nucléicos ocorre com a solubilização diferencial do DNA em solução aquosa por bipartição em solventes orgânicos, que possuem afinidade para proteínas, polissacarídeos, lipídeos e outras frações celulares. É realizada geralmente através do uso da mistura fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico e

clorofórmio:álcool-isoamílico (TSAI; OLSON, 1992; ZHOU; BRUNS; TIEDJE, 1996).

A concentração do DNA é realizada com a adição de etanol, de isopropanol ou de polietilenoglicol (PEG). Para a purificação do DNA várias metodologias podem ser utilizadas, dentre elas o uso da eletroforese em gel de agarose, centrifugação diferencial com gradiente de cloreto de cério com brometo de etídeo, o uso de resinas separadoras por tamanho molecular, resinas de troca-iônica e resinas de sílica (TORSVIK *et al.*, 1990; TSAI; OLSON, 1992; ZHOU; BRUNS; TIEDJE, 1996). Além de simples e rápidos, também é esperado que esses protocolos sejam eficientes em solos com diferentes características físicas, químicas ou diferentes quantidades de matéria orgânica.

Um dos maiores obstáculos na etapa de extração de DNA do solo é a co-extração das substâncias húmicas. As substâncias húmicas consistem de uma mistura de resíduos oriundos da decomposição química e biológica de plantas e animais, podendo ser divididas, de acordo com a solubilidade em soluções ácidas e básicas em: ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina (STEFFAN *et al.*, 1988; BACHOON; OTERO; HODSON, 2001). A presença dessas substâncias no DNA isolado pode inibir a *Taq* DNA polimerase nas reações de PCR, interferir na digestão do DNA com enzimas de restrição, reduzir a eficiência da ligação de DNA com T4 DNA ligase, reduzir a eficiência na transformação e na especificidade de hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA (TSAI; OLSON, 1992; TEBBE; VAHJEN, 1993). Além disso, como as substância húmicas apresentam altos coeficientes de absorvidade no espectro ultra-violeta, a quantificação de DNA por espectrometria é também dificultada

devido a superestimação dos valores obtidos (BACHOON; OTERO; HODSON, 2001).

2.2.2 Construção da biblioteca metagenômica

A construção de uma biblioteca metagenômica está baseada nos mesmos métodos de clonagem de DNA genômico de organismos, ou seja, fragmentação do DNA por digestão enzimática ou quebra mecânica, ligação dos fragmentos de DNA a um vetor apropriado e transformação numa célula hospedeira. A escolha do vetor apropriado dependerá da qualidade do DNA isolado, do tamanho do inserto desejado, do número de cópias do vetor, do hospedeiro e da estratégia de triagem que será utilizada (HENNE *et al.*, 1999).

Os vetores utilizados podem carregar insertos curtos de até 10 kb, como os plasmídeos; ou insertos mais longos de tamanho entre 25 kb a 40 kb, como cosmídeos e fosmídeos (tamanho mínimo de 25 kb para empacotamento no capsídeo) ou 100 kb, como BAC (LI *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2006; LAMMLE *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009). As bibliotecas com insertos longos, por exemplo, aquelas construídas em BAC, são utilizadas normalmente para detectar atividades codificadas por vários genes, como operons responsáveis pela biossíntese de antibióticos (GILLESPIE *et al.*, 2002). Por outro lado, bibliotecas com insertos curtos são utilizadas normalmente para triagem de genes que codificam enzimas hidrolíticas (lipases, proteases, amilases, fosfatases), cujo tamanho médio dos genes é de 1-2 kb (LAMMLE *et al.*, 2007). Bibliotecas

utilizando fosmídeos ou cosmídeos, com inserto de 30-40 kb podem ser utilizadas tanto para triagem de produtos codificados por vários genes ou um único gene (KIM *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2008; VAN ELSAS; SPEKSNIJDER; OVERBEEK, 2008).

Os procedimentos experimentais, quando se trabalham com insertos longos, são mais trabalhosos quando comparado aos procedimentos utilizando insertos menores, principalmente no que diz respeito ao isolamento de DNA de alta massa molecular. Este procedimento também acarreta na necessidade de se construir uma sub-biblioteca para a identificação do gene de interesse. Por outro lado, como cada clone da biblioteca carrega mais informação genética, menos clones serão necessários para realização da triagem (DANIEL, 2005). A Tabela 1 mostra alguns exemplos de bibliotecas metagenômicas construídas para triagem funcional de diferentes genes.

A construção de vetores específicos para bibliotecas metagenômicas também é uma alternativa interessante utilizada em alguns trabalhos. Para facilitar a expressão dos genes, o plasmídeo pJOE930 foi construído com dois promotores convergentes *lac* em ambos os lados do sítio de policlonagem, o que permite a expressão bidirecional do gene a partir do seu próprio promotor ou dos 2 promotores do vetor, independente da orientação do inserto (ALTENBUCHNER; VIELL; PELLETIER, 1992; LAMMLE *et al.*, 2007). Outro exemplo é o vetor pRS44, que tem compatibilidade e capacidade de ser transferido para várias espécies hospedeiras (ex. *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris*) por conjugação, podendo assim aumentar a chance de expressão dos genes pela variação da maquinaria metabólica dos diferentes hospedeiros (AAKVIK *et al.*, 2009).

Tabela 1. Exemplos de bibliotecas metagenômicas.

Atividade	Amostra ambiental	Vetor (tamanho médio do inserto em kb)	No. de clones da biblioteca metagenômica (clones com atividade)	Referência
Lipase / esterase	Solo de plantação de beterraba	Plasmídeo (7)	1.016.000 (4)	HENNE <i>et al.</i> , 2000
Utilização de 4-hidroxibutirato	Solo de plantação de beterraba	Plasmídeo (7)	930.000 (5)	HENNE <i>et al.</i> , 1999
Quitinase	Água do mar	Fago lambda (6)	825.000 (23)	COTTRELL; MOORE; KIRCHMAN, 1999
Amilase	Solo agrícola	BAC (27)	3.648 (8)	RONDON <i>et al.</i> , 2000
Amilase	Solo de margen de rio	Plasmídeo (5)	30.000 (1)	YUN <i>et al.</i> , 2004
Lipase, Esterase, Protease, Fosfatase, Amilase, Produção de pigmentos	Solo de compostagem	Plasmídeo (5)	31.967 Lipase/esterase (14) Protease (nenhum) Fosfatase (13) Amilase (38) Produção de pigmentos (2)	LAMMLE <i>et al.</i> , 2007
Metabólitos secundários	Solo agrícola	Cosmídeo*	5.000 (5)	COURTOIS <i>et al.</i> , 2003
Metabólitos secundários	Solo agrícola	BAC (42)	3.648 (1)	RONDON <i>et al.</i> , 2000
Esterases	Sedimento do mar	Fosmídeo (30)	60.000 (5)	KIM <i>et al.</i> , 2006

* não informado

2.2.3 Métodos de triagem

De maneira geral, duas estratégias são utilizadas para análise e identificação de novas enzimas ou genes a partir das bibliotecas metagenômicas: a triagem funcional e a triagem baseada na seqüência (HANDELSMAN, 2004). A triagem baseada na seqüência pode envolver o seqüenciamento aleatório dos clones para a identificação dos genes de interesse, ou ainda o seqüenciamento completo dos clones que possuem âncoras filogenéticas (ex. gene 16S rDNA) que indicam a origem do inserto (STEIN *et al.*, 1996).

A forma mais utilizada nessa abordagem para identificação de genes candidatos é através da utilização de seqüências conservadas de DNA já conhecidas. Essas seqüências permitem a construção de sondas ou mesmo de oligonucleotídeos iniciadores degenerados para a hibridização utilizando os clones da biblioteca ou a amplificação dos genes por PCR, respectivamente (KNIETSCH *et al.*, 2003a; LILES *et al.*, 2003; GINOLHAC *et al.*, 2004; ROBERTSON *et al.*, 2004). Essa abordagem foi usada para identificar genes que codificam enzimas com motivos conservados como as polietileno sintases (GINOLHAC *et al.*, 2004).

Aproximadamente 2.000 espécies diferentes, incluindo 148 espécies de bactérias não-conhecidas foram identificadas utilizando seqüenciamento por fragmentos aleatórios (*shotgun*) numa expedição realizada no Mar dos Sargãos, no oceano Atlântico Norte (VENTER *et al.*, 2004). Recentemente, a tecnologia de pirosequenciamento de DNA juntamente com o aperfeiçoamento

da análise bioinformática tem permitido o sequenciamento de DNA de comunidades de bactérias não-cultiváveis (TYSON *et al.*, 2004; PETROSINO *et al.*, 2009). Essa estratégia tem sido utilizada juntamente com a metabolômica para o estudo da composição, função e evolução da microbiota presente no aparelho digestivo humano (TUOHY *et al.*, 2009).

Na triagem funcional, os clones que expressam uma atividade específica são selecionados de uma biblioteca metagenômica mantida em um hospedeiro heterólogo (Ex.: *Escherichia coli*). Em meios indicadores adequados, clones contendo genes que codificam para a atividade desejada formam colônias que apresentam uma característica distinguível.

Clones com atividade lipolítica a partir de uma biblioteca metagenômica de solo foram detectados através da formação de halos claros em meio sólido contendo trioleína ou tributirina (HENNE *et al.*, 2000; VOGET *et al.*, 2003). Clones de *E. coli* com atividade proteolítica foram identificados através da formação de halos em volta das colônias em placas com meio sólido contendo leite desnatado (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). Para identificar clones que expressavam enzimas hidrolíticas (amilases, proteases, queratinases, quitinases e lipases), Rondon e colaboradores (2000) prepararam meios sólidos que continham os respectivos substratos para as enzimas (amido solúvel, leite em pó desnatado, queratina em pó, quitina em pó e Bacto-lipid, respectivamente) (RONDON *et al.*, 2000).

Derivativos insolúveis ou cromóforos do substrato da enzima podem ser incorporados no meio sólido de crescimento para a monitoração da atividade de cada clone da biblioteca. A alta sensibilidade desse tipo de triagem permite

a detecção de atividades não convencionais, tais como genes conferindo atividade poliol-oxidoreductase (KNIETSCH *et al.*, 2003b). A coloração da colônia pode ser utilizada como um método simples de triagem inicial para a identificação de clones que produzem metabólitos secundários, tais como os antibióticos (BRADY *et al.*, 2001; GILLESPIE *et al.*, 2002).

Etapas de enriquecimento anteriores construção da biblioteca metagenômica podem ser incluídas para aumentar a chance de detectar atividade. Na maioria das vezes, fontes de carbono ou nitrogênio que são específicas para as espécies que possuem o gene de interesse são utilizadas como substratos no crescimento. Desta forma, genes que codificam para a enzima 4-hidroxibutirato desidrogenase foram identificados em clones de *E. coli* crescidos em meio com 4-hidroxibutirato como única fonte de carbono (HENNE *et al.*, 1999). Essa estratégia também foi utilizada para isolar genes que codificam desidratases, amidases e agarases (KNIETSCH *et al.*, 2003a; VOGET *et al.*, 2003; GABOR; VRIES; JANSSEN, 2004).

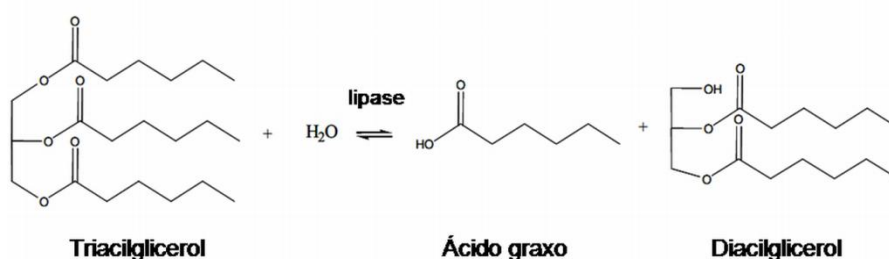
2.3 Enzimas lipolíticas

2.3.1 Definição e estrutura

Enzimas lipolíticas incluem as lipases (EC 3.1.1.3), que são produzidas pelos organismos vivos incluindo animais, plantas, fungos e bactérias (JAEGER *et al.*, 1994). As lipases são hidrolases que atuam na ligação éster da carboxila de acilgliceróis liberando ácidos graxos e glicerol, ou a reação

inversa, conforme mostrado na Figura 2 (JAEGER *et al.*, 1994; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Figura 2. Reação enzimática de uma lipase catalisando a hidrólise ou a síntese de um triacilglicerol.



O principal substrato das lipases são triacilgliceróis constituídos por ácidos graxos de cadeia longa, normalmente com mais de 10 carbonos e tendo o trioleilglicerol (C18) como substrato padrão para lipases verdadeiras. De fato, a capacidade de atuar sobre acilgliceróis de cadeia longa é um critério utilizado para definição das lipases e também a forma mais aceita de diferenciação em relação às esterases, que agem sobre acilgliceróis de cadeia curta (ARPIGNY; JAEGER, 1999; CHAHINIAN *et al.*, 2002).

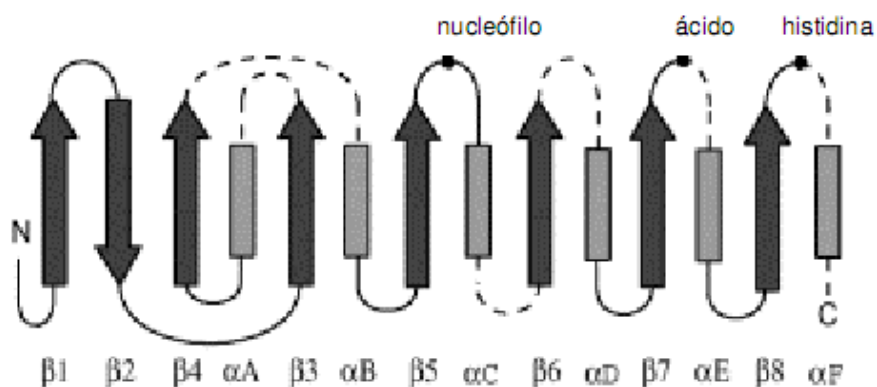
Outro critério utilizado para se classificar as lipases se baseia no fenômeno denominado “ativação interfacial”, onde a lipase é ativada quando

em contato com a interface formada entre a água e o lipídio (VERGER, 1997). Com a determinação da estrutura terciária de duas lipases, uma lipase pancreática humana e uma lipase do fungo *Rhizomucor miehei*, a teoria da ativação interfacial foi explicada com maiores detalhes (BRADY *et al.*, 1990; WINKLER; D'ARCY; HUNZIKER, 1990). Nesta hipótese, as lipases possuem uma cadeia polipeptídica situada na superfície da enzima denominada “lid”, que cobre o sítio ativo da enzima tornando a mesma inacessível para as moléculas do substrato. Entretanto, quando a lipase entra em contato com a interface entre água e o lipídio, uma mudança conformacional ocorre causando o movimento da “lid”, expondo o sítio ativo, e consequentemente aumentando a interação hidrofóbica entre a enzima e a superfície do lipídeo (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991).

Porém, esses critérios (ativação interfacial e “lid”) para se classificar as lipases se tornaram inapropriados devido ao surgimento de algumas exceções. Por exemplo, nas bactérias *Burkholderia glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida antartica* apresentam lipases que possuem o domínio com a “lid”, porém não apresentam ativação interfacial (JAEGER *et al.*, 1993; NOBLE *et al.*, 1993; UPPENBERG *et al.*, 1994). Lipases de *Bacillus subtilis* não apresentam ativação interfacial nem “lid” (EGGERT *et al.*, 2001). Diante dessas constatações, a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa ($C>10$) tem sido aceita como um critério mais coerente para caracterizar uma lipase verdadeira. Lipases também hidrolisam acilgliceróis de cadeia curta ($C<10$) como as esterases, porém máxima atividade ocorre quando o substrato forma emulsões (VERGER, 1997).

Nos trabalhos de determinação da estrutura de lipases tanto de procariotos quanto de eucariotos, é verificado o padrão de dobramento do tipo α/β -hidrolase (SCHRAG; CYGLER, 1997; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Esse dobramento apresenta uma região central formado por fitas β -pregueadas paralelas cercado por várias fitas em α -hélice (Figura 3). O sítio catalítico das lipases é formado por 3 resíduos: Ser, Asp/Glu e His, que formam a tríade catalítica (SCHRAG; CYGLER, 1997).

Figura 3. Estrutura canônica do dobramento α/β -hidrolase de lipases.



O dobramento α/β -hidrolase e a tríade catalítica foram observadas inicialmente em serina proteases e após em várias serina hidrolases. Essas proteínas não possuem alta similaridade em relação as suas sequência de aminoácidos, mas estudos indicam que divergiram a partir de uma proteína ancestral comum ao longo da evolução (NARDINI; DIJKSTRA, 1999). O

resíduo nucleófilo catalítico em lipases é a serina, localizada na porção C-terminal da fita $\beta 5$ e no centro de um pentapeptídeo altamente conservado Gly-X-Ser-X-Gly (onde “X” se refere a qualquer aminoácido) (JAEGER *et al.*, 1994; JAEGER; REETZ, 1998).

2.3.2 Classificação das lipases e esterases

As lipases e esterases são classificadas de acordo com a sequência de aminoácidos e suas propriedades, em oito famílias. As lipases verdadeiras compreendem os membros da família I, que são divididos em sete subfamílias (ARPIGNY; JAEGER, 1999). No entanto, novas enzimas lipolíticas têm sido isoladas e identificadas pela análise metagenômica e novas famílias têm sido propostas. Através da descoberta de LipG, a partir de uma biblioteca metagenômica de planície de maré, foi proposta uma nova família de lipases (LEE *et al.*, 2006). Em outro estudo, utilizando também a metagenômica, foi isolada a lipase LipEH166 juntamente com a proposta de criação de uma nova família (KIM *et al.*, 2009).

2.3.3 Lipases na biotecnologia

As lipases constituem um grupo de catalisadores com várias aplicações biotecnológicas devido as suas características, tais como: amplo reconhecimento de substratos, alta estereoseletividade, estabilidade em

solventes orgânicos e a falta de necessidade de cofatores (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER; EGGERT, 2002). O campo comercial mais importante para aplicação das lipases encontra-se na indústria de detergentes e limpeza (JAEGER; REETZ, 1998). As lipases utilizadas para esse fim devem ser enzimas capazes de atuar sobre uma grande variedade de gorduras, apresentando dessa forma, baixa especificidade ao substrato. Além disso, devem ter atividade sob as condições de limpeza (pH 10-11 e 30 °C-60 °C) e estabilidade frente as condições químicas desnaturantes presentes na formulação do produto (JAEGER; REETZ, 1998).

As lipases também são utilizadas no tratamento de efluentes e na indústria de papel e celulose para remoção de triacilgliceróis e ceras. Na indústria de alimentos pode ser utilizada para lipólise de manteiga e cremes, como aditivo na produção de queijos, panificação, e esterificação de gorduras e óleos (PANDEY *et al.*, 1999; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). A estereoseletividade das lipases é útil na síntese de biopolímeros como polifenóis e poliésteres, na resolução cinética de misturas racêmicas de álcoois secundários em reações de hidrólise, na esterificação e transesterificação (SCHULZ; PLEISS; SCHMID, 2000; JAEGER; EGGERT, 2002).

2.4 Manguezais

Os manguezais são as formações vegetais dominantes em planícies entre-marés abrigadas de regiões tropicais e subtropicais, recobrimdo uma área de 181.000 km² no globo, o que representa 1% do total das florestas

continentais em todo mundo (SPALDING; BLASCO; FIELD, 1997). Os manguezais mais desenvolvidos ocorrem em deltas ou estuários, locais que recebem um aporte importante de sedimentos provenientes tanto do mar quanto do continente, fazendo com que sejam ambientes de transição de alta produtividade. Seu solo é anaeróbio, com predominância de frações finas (silte e argila), elevadas concentrações de matéria orgânica e sais solúveis (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 2000). Além disso, manguezais estão expostos as constantes variações das marés e alta salinidade. Os organismos que vivem nesse ecossistema sofreram adaptações morfológicas, ecológicas e fisiológicas para sobreviver nessas condições adversas (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 2000).

A atividade dos microrganismos é a principal responsável pela transformação de nutrientes nos manguezais (ALONGI *et al.*, 1993). Nos manguezais tropicais, bactérias e fungos representam 91% da biomassa total microbiana, enquanto algas e protozoários somente 7% e 2%, respectivamente (ALONGI, 1994). Bactérias participam de processos fundamentais para o funcionamento desse habitat, particularmente no controle do ambiente químico dos sedimentos. Participam desses processos bactérias redutoras de sulfato, bactérias metanogênicas, bactérias que solubilizam fosfato e bactérias fixadoras de nitrogênio que estão presentes na rizosfera das árvores que formam o mangue (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

Apesar da sua importância na transformação de nutrientes, estudos sobre a comunidade bacteriana no solo de mangue ainda são limitados e mais informações são necessárias para um melhor conhecimento dessas

populações (EL-TARABILY, 2002; AL-SAYED; GHANEM; SALEH, 2005). As adaptações das espécies bacterianas às condições particulares do manguezal representam uma fonte potencial explorável para novos recursos biotecnológicos (PANDEY *et al.*, 2000).

3. JUSTIFICATIVA

Manguezais são ecossistemas produtivos e biologicamente importantes no litoral brasileiro. As comunidades microbianas presentes no solo de mangue participam ativamente de vários processos ecológicos e são os principais responsáveis pela transformação de nutrientes, essencial para o equilíbrio desse ecossistema. Pouco se sabe sobre a diversidade genética e metabólica desse ambiente, em consequência, torna-se necessário seu estudo para a descoberta de novos genes e vias metabólicas. Este trabalho visou isolar e caracterizar novas enzimas (lipases, proteases, amilases e celulasas) de microrganismos do solo de mangue através de um método independente de cultivo: a metagenômica.

4. OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve como objetivo geral isolar enzimas hidrolíticas, incluindo lipases, de uma biblioteca metagenômica de solo de mangue do litoral do Paraná.

4.1 Objetivos específicos

- Isolar DNA metagenômico a partir do solo de mangue,
- Construir uma biblioteca metagenômica em vetor do tipo fosmídeo,
- Realizar a triagem funcional da biblioteca metagenômica para identificação de lipases, proteases, amilases e celulasas,
- Determinar a sequência e realizar análise dos genes responsáveis pela atividade lipolítica,
- Caracterizar lipases quanto a especificidade ao substrato, temperatura e pH ótimos,

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Estirpes e plasmídeos

As bactérias e os vetores utilizados nesse trabalho estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Bactérias e vetores utilizados.

Estirpes	Genótipo	Fonte
<i>E. coli</i>		
DH10B	F ⁻ <i>endA1 recA1 galU galK deoR nupG rpsL</i> $\Delta lacX74 \Phi 80 lacZ \Delta M15 araD139$ $\Delta(ara, leu)7697 mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-$ $mcrBC) \lambda^{-}$	Invitrogen
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96</i> <i>deoR nupG</i> $\Phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta(lacZYA-$ $argF)U169, hsdR17 (r_k^{-} m_k^{+}), \lambda^{-}$ F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$	Invitrogen
EPI300-T1R	$\phi 80 d lacZ \Delta M15 \Delta lacX74 recA1 endA1$ <i>araD139</i> $\Delta(ara, leu)7697 galU galK \lambda^{-} rpsL$ <i>nupG tonA</i>	Epicentre
BL21(λ DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> λ DE3 <i>pLysS (cm^R)</i>	Novagen

Fosmídeos/ plasmídeos		
pCC2FOS	Cm ^R F ⁻ <i>oriV</i> <i>cos</i> P1 <i>loxP</i> T7	Epicentre
pUC19	Amp ^R	Invitrogen
pET28b+	KmR, vetor de expressão com o promotor do fago T7 que gera proteína fusionada a uma cauda com 6 histidinas na porção N-terminal	Novagen
pCC2-Lip	Vetor pCC2FOS contendo o gene <i>lipA</i>	Este trabalho
pUC-LipA	Vetor pUC19 contendo o gene <i>lipA</i>	Este trabalho
pET28-LipA	Vetor pET28b+ contendo o gene <i>lipA</i>	Este trabalho
pCR2.1	Km ^R	Invitrogen

5.2 Meios de Cultivo para *E. coli*

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas no meio Luria-Bertani (LB), Terrific-Broth (TB), SOB e SOC. O meio LB apresenta a seguinte composição (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989):

LB	g/litro
Extrato de levedura	5,0
NaCl	10,0
Triptona	10,0

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 2M. O meio sólido foi obtido a partir da adição de ágar na concentração de 15 g/L ao meio líquido e foi denominado LA.

O meio TB (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) foi usado para armazenamento dos clones da biblioteca metagenômica. Apresenta a seguinte composição:

TB	g/litro
Extrato de levedura	24,0
Triptona	12,0

Para o preparo de células eletrocompetentes as estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio SOB (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Para recuperação das células após eletroporação foi usado o meio SOC. O meio SOB possui a seguinte composição:

SOB	<i>Gramas/litro</i>
Extrato de levedura	5,0
Triptona	20,0
NaCl	0,6
KCl	0,186

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 2M. O meio SOC foi obtido com a adição de 3,6 g/L de glucose, 0,94 g/L de MgCl₂ e 1,2 g/L de MgSO₄ ao meio SOB.

5.3 Antibióticos

Os antibióticos empregados e suas respectivas concentrações finais foram: ampicilina 200 µg/mL, canamicina 100 µg/mL, tetraciclina 10 µg/mL, cloranfenicol 12,5 µg/mL e estreptomicina 20 µg/mL. As soluções estoque dos antibióticos foram preparadas como descrito por SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS (1989) sendo mantidas a 4 °C.

5.4 Localização e coleta das amostras

As amostras de solo foram coletadas de uma floresta de mangue preservada composta principalmente por mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) localizada na região estuarina do Rio Maciel, no Pontal do Paraná-PR, Brasil (Figura 4). Quatro amostras foram coletadas ao redor de uma árvore de mangue-vermelho (distância de 30 cm a partir do tronco), superficialmente (0-5 cm de profundidade) durante o período de maré-baixa, numa mesma coordenada GPS 25°33'42"S/48°25'16,1"W. Imediatamente após a coleta, as quatro amostras de solo foram misturadas em uma única amostra que foi armazenada em gelo durante 12 h até extração do DNA.

Figura 4. Imagem de satélite indicando a região de coleta do solo no litoral paranaense.



Fonte: Google Earth (<http://earth.google.com/>)

5.5 Análise granulométrica e de matéria orgânica do solo

A análise do solo foi realizada no Laboratório de Sedimentologia do Centro de Estudos do Mar (CEM-UFPR). A granulometria da amostra foi feita através do peneiramento das frações grosseiras e pipetagem das frações finas. As frações lamosas (partículas <0,062 mm) foram analisadas utilizando-se o método de pipetagem (SUGUIO, 1973). A matéria orgânica total foi determinada pela diferença entre o peso seco (60 °C, 24 h) do solo e o peso residual após a combustão em 450 °C por 2 h (BYERS; MILLS; STUART, 1978).

5.6 Extração do DNA do solo

Antes da extração do DNA, uma etapa de lavagem foi realizada. Para isso, 100 g de solo foram resuspendidos em 500 mL de tampão fostato 100 mM, pH 7,5 e incubados em shaker a 150 rpm a 20 °C durante 30 min. Após centrifugação a 16.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o processo de lavagem repetido mais 2 vezes com 500 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,5.

Na extração do DNA foram testados dois métodos de extração: um método indireto realizado segundo Hardeman e Sjoling (2007) e um método direto realizado de acordo com Zhou; Bruns e Tiedje (1996). O escolhido para dar prosseguimento neste trabalho foi o método indireto descrito a seguir. Cem gramas de solo foram combinados com 100 mL de tampão TE-pirofosfato

(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM pirofosfato de sódio, pH 8,0) e misturados sob leve agitação durante 30 min. Após adição de 100 mL de tampão CTAB (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 27 mM brometo de cetil-trimetilamônio), a mistura foi homogeneizada utilizando um mixer por 30 seg na velocidade máxima. O solo foi separado das células bacterianas por centrifugação a 500 x g por 10 min a 10 °C. O sobrenadante foi recuperado e armazenado. O solo foi ressuspensionado em 200 mL de tampão CTAB, e a etapa de homogeneização/centrifugação repetida por mais duas vezes.

Os três sobrenadantes foram combinados e as células bacterianas foram coletadas após centrifugação a 10.000 x g por 30 min. Ao precipitado de células foram adicionados 10 mL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e alíquotas de 750 µL foram preparadas. As células foram lisadas em cada alíquota após incubação com 30 µL de 10% SDS e 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) por 1 h a 37 °C. A cada alíquota foram adicionados 100 µL de 5M NaCl e 80 µL de CTAB/NaCl (10% CTAB, 0,7 M NaCl), seguido pela incubação a 65 °C durante 10 min. O DNA foi extraído com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado após adição de 0,6 volumes de isopropanol. Após ressuspensão em água Milli-Q estéril e purificado através de duas corridas eletroforéticas em gel de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) 0,8% conforme o Item 5.14.

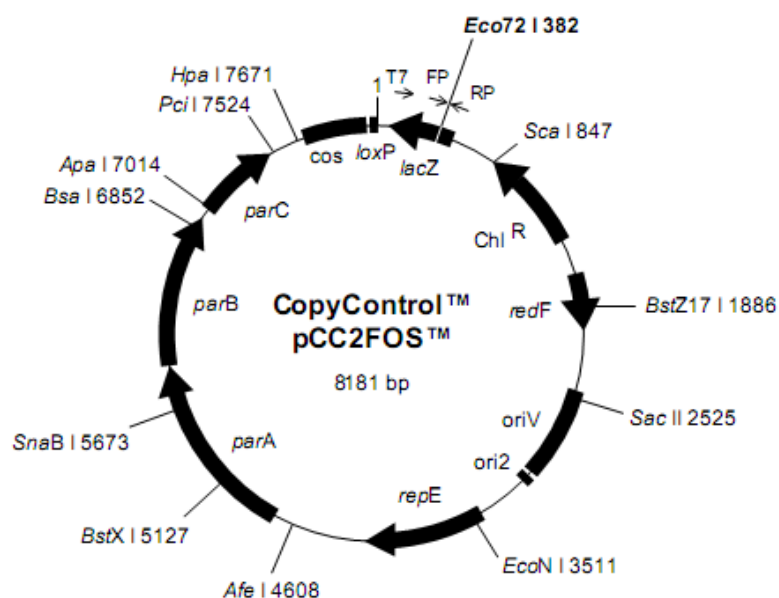
O método direto proposto por Zhou; Bruns e Tiedje (1996) foi realizado da seguinte maneira: cinco gramas de sedimento foram misturados com 13,5 mL de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA, 100 mM

fosfato de sódio pH 8,0, 1,5 M NaCl, 1% CTAB) e 100 µL de proteinase K (100 mg/mL) em um tubo de centrifuga (Oak Ridge) que foi mantido sob agitação a 225 rpm durante 60 minutos a 37 °C. Após agitação, 1,5 mL de SDS 20% foram adicionados e a amostra foi incubada a 65 °C em banho-maria por 2 horas. Durante esse período, a cada 20 minutos foram realizadas inversões suaves do tubo. A solução sobrenadante foi coletada após centrifugação a 6.000 x g por 10 minutos. Essa solução foi misturada com um volume igual de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v) e após centrifugação a fase aquosa foi colocada em outro tubo e o DNA foi precipitado com a adição de 0,6 volumes de isopropanol após incubação a temperatura ambiente durante 60 min. O precipitado obtido por centrifugação a 10.000 x g durante 40 minutos a temperatura ambiente foi em seguida lavado com etanol 70% e ressuspenso em água Milli-Q estéril.

5.7 Construção da biblioteca metagenômica

A biblioteca metagenômica foi construída com o kit *CopyControl Fosmid Library production kit* (Epicentre) de acordo com as instruções do fabricante. O kit utiliza um vetor do tipo pCC2FOS, que possui marcador de resistência a cloranfenicol e o sítio *cos* para empacotamento no fago lambda. Além disso, o pCC2FOS possui duas origens de replicação: *ori2*, para manutenção do fosmídeo numa única cópia em *E. coli* e *oriV*, que possibilita o aumento no número de cópias (10-200) do fosmídeo após indução com arabinose (Figura 5).

Figura 5: Mapa do vetor pCC2FOS utilizado para a construção da biblioteca metagenômica.



O DNA de alta massa molecular foi tratado com enzimas (“end-repair enzyme mix”) para criar fragmentos com pontas-cegas e fosforiladas na porção 5’. Esses foram ligados no fosmídeo pCC2FOS (Epicentre) e ao produto de ligação foi adicionado o extrato do fago lambda para o empacotamento das moléculas recombinantes no fago seguido pela transfecção das células de *E. coli* EPI300-T1^R. Os transfectantes foram plaqueados e crescidos em meio LA com 12,5 µg/mL de cloranfenicol a 37 °C durante 24 h. Os clones foram individualmente transferidos e crescidos a 37 °C em microplacas de 96 poços com meio TB e 12,5 µg/mL de cloranfenicol. Após 12 h de crescimento, glicerol na concentração final de 50% foi adicionado a cada poço e as placas foram armazenadas em freezer a -20 °C.

5.8 Triagem da biblioteca metagenômica

Todos os clones da biblioteca foram testados quanto as suas capacidades de produzir algumas enzimas hidrolíticas, entre as quais: lipases, amilases, celulasas e proteases. Para isso os clones armazenados no freezer foram transferidos com auxílio de um repicador 96 pinos para placas de petri com os meios sólidos contendo os respectivos substratos específicos para as atividades.

5.8.1 Triagem para atividade lipolítica

Para verificação da atividade lipolítica os clones foram repicados em meio contendo meio LA, 1% tributirina, 0,1% goma arábica, 12,5 µg/mL de cloranfenicol e 0,001% de arabinose. As células foram crescidas a 37 °C durante 48 h e as colônias com um halo claro indicando hidrólise foram selecionadas.

5.8.2 Triagem para atividade protease

A atividade proteolítica foi verificada em meio LA contendo 1% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) (RONDON *et al.*, 2000). Foi verificada a

formação de um halo claro ao redor da colônia após 96 h de incubação a 37 °C.

5.8.3 Triagem para atividade amilase

A capacidade dos isolados em produzir amilase foi detectada em meio LA contendo 1% de amido de batata solúvel (Sigma). Após 48 h de incubação a 37°C, 50 mL de uma solução de KI/I₂ (3,3 mg/mL I₂, 2,8 mg/mL KI) foram dispersos diretamente sobre o meio e as colônias. Após foi verificada a formação de uma zona translúcida ao redor da colônia que indica a hidrólise do amido (LÄMMLE *et al.*, 2007).

5.8.4 Triagem para atividade carboximetilcelulase

A produção de carboximetilcelulase foi detectada em meio LA contendo 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) (Minérios Ouro Branco). Após 96 h de incubação a 37 °C, o meio foi coberto com uma solução 0,1% (m/v) de corante vermelho congo durante 30 min, lavado uma vez com água destilada e seguido por 3 lavagens em solução 1 M NaCl até o aparecimento de um halo amarelado que indica atividade.

5.8.5 Triagem para atividade celulase

A celulase foi avaliada em meio LA contendo 0,3% de celulose cristalina (Avicel). Ao final de 144 h de incubação a 37 °C, a visualização do halo foi realizada da mesma forma que para a carboximetilcelulase.

5.9 Construção da biblioteca secundária e triagem para atividade de lipase

O foscímico do clone com atividade foi purificado pelo método de lise alcalina conforme o Item 5.10. Dois microgramas do foscímico purificado foram parcialmente digeridos com 0,3 U da enzima de restrição *Sau3AI* durante 20 min a 37 °C. Fragmentos de DNA entre 5-8 kb foram isolados e purificados após corrida eletroforética em gel agarose LMP. Os fragmentos de DNA foram ligados no plasmídeo pUC19 cortado com a enzima *BamHI* e a ligação transformada por eletroporação em células de *E. coli* DH5 α . Essa biblioteca secundária foi analisada para atividade lipolítica em meio LA com 1% tributirina, 0,1% goma arábica e 100 μ g/mL, através da formação de halo de hidrólise dos clones.

5.10 Minipreparação de plasmídeos

A purificação de plasmídeos e fosmídeos de *E. coli* foi realizada segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). De uma cultura saturada foram coletados 1,5 mL que foram centrifugados a 10.000 x g. O precipitado de células foi ressuspenso em 150 µL da solução GET (glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0 e EDTA 10 mM). Foram adicionados 150 µL de uma solução de lise (1% SDS (m/v) e 0,2 M NaOH), a mistura foi homogeneizada com inversão suave do tubo, seguido pela incubação por 5 min até o aparecimento de uma solução translúcida. Após a lise, foram adicionados 150 µL da solução Kacf (3 M acetato de potássio e 1,8 M ácido fórmico). Após suave inversão, a mistura foi incubada em gelo durante 10 min e centrifugada por 5 min a 10.000 x g. O sobrenadante foi coletado, 100 µL da mistura fenol-cloroformio-álcool isoamílico (25:24:1) (v/v/v) foram adicionados seguido de agitação em vortex e centrifugação por 5 min a 10.000 x g. A fase aquosa foi coletada e a esta 2,5 volumes de etanol absoluto foram adicionados. Após centrifugação durante 10 min a 10.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA lavado com 1 mL de etanol 80%. Descartou-se o sobrenadante, e após secagem em estufa a 37°C, o DNA foi solubilizado em água Milli-Q estéril.

5.11 Preparo das células eletrocompetentes

Colônias isoladas de *E. coli* DH10B foram inoculadas em 3 mL de meio LB e incubado a 37 °C sob agitação de 160 rpm durante a noite. Meio mililitro do inóculo saturado de células foi diluído em 50 mL de meio SOB em frasco Erlenmeyer de 250 mL. A cultura foi incubada nas mesmas condições que o inóculo, até atingir D.O. 600 nm de 0,5. Quando a cultura atingiu este estágio, o frasco foi colocado em gelo durante 30 min. O meio contendo as células foi transferido para os tubos de centrífuga tipo Oak Ridge (Nalgene, 42 mL de capacidade) gelados, que foram centrifugados a 2.500 x *g* durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 40 mL de água Milli-Q gelada. Este procedimento foi repetido mais uma vez com o mesmo volume de água Milli-Q. Após a última centrifugação, as células foram lavadas com 20 mL de glicerol 15% (m/v) e ressuspendidas no próprio glicerol 15% que ficou na parede do frasco, deixando o frasco na posição vertical em gelo após centrifugação. As células foram transferidas para tubos tipo eppendorfs (alíquotas de 30 µL) e armazenadas a -70 °C.

5.12 Transformação por eletroporação

Alíquotas de 30 µL de células eletrocompetentes foram descongeladas em gelo antes da eletroporação. Na câmara de eletroporação foi pipetada a suspensão de bactérias eletrocompetentes (30 µL), e 0,5-1,0 µL da amostra

contendo o DNA a ser transformado. As bactérias foram submetidas a choque de 1.800 Volts (25 μ F e 200 Ω), e depois transferidas para 1 mL de meio SOC e incubadas a 37 °C durante 45 min para recuperação. Após este período, 100 μ L da mistura foram plaqueados em meio LA contendo o antibiótico apropriado. Após 16 h de crescimento a 37 °C foi observada o crescimento de colônias na placa.

5.13 Eletroforese de DNA

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de ágar ou agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS (1989). O DNA foi visualizado, após tratamento com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL), em transluminador de luz ultravioleta. O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP BioImaging Systems).

5.14 Purificação de DNA do gel de agarose de baixo ponto de fusão (LMP)

Para a obtenção de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose LMP, foi utilizada uma metodologia descrita por BANKIER; WESTON; BARREL (1987). Após eletroforese o gel foi corado com azul de metileno 0,01%, lavado com água Milli-Q e as bandas de DNA foram visualizadas em um transluminador. A banda de interesse foi recortada e o gel fundido à temperatura de 65 °C e teve seu volume determinado. Após, foram adicionados 250 mmol/L de NaCl, 100 mmol/L de Tris-HCl pH 8,0 e 1 mmol/L de EDTA

(concentração final). Esta mistura foi aquecida novamente a 65 °C para a manutenção da agarose no estado líquido, sendo então adicionado 1 volume de fenol equilibrado (pH 8,0) para extração. A mistura foi homogeneizada em vortex e posteriormente centrifugada por 15 min a 10.000 x g. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e extraída com 1 volume de clorofórmio. A fase aquosa foi novamente transferida para outro tubo, e o DNA precipitado com a adição de 1 volume de isopropanol, em banho de gelo por 15 min. Após precipitação, o DNA foi sedimentado por centrifugação a 10.000 x g por mais 15 min. O precipitado foi lavado com etanol 80%, seco e ressuspenso em água Milli-Q estéril.

5.15 Seqüenciamento de DNA e construção dos mutantes LipA

Para o seqüenciamento e construção dos mutantes do gene *lipA* foi utilizada uma técnica *in vitro* de inserção de transposons na sequência de DNA com o kit EZ-Tn5<KAN-2> *Insertion Kit* (Epicentre). Transposons são sequências de DNA que podem se mover aleatoriamente no genoma de uma célula num processo conhecido como transposição. O kit comercial utilizado se baseou na transposição tanto para causar mutação insercional quanto para o seqüenciamento do gene *lipA*, pois o transposon também contém sítios de ligação para oligonucleotídeos iniciadores para a reação de seqüenciamento. A reação de transposição *in vitro* foi realizada de acordo com o fabricante (Epicentre) e foi composta pelo DNA molde (plasmídeo pUC-LipA), um transposon (que contém sítios de ligação para os oligonucleotídeos iniciadores

e um marcador de resistência a canamicina), e a enzima Tn5 transposase, responsável pela inserção do transposon no DNA do plasmídeo.

As reações foram realizadas com 0,2 µg de DNA, 1 µL de tampão de reação (10X concentrado), 0,2 µL do transposon, 0,3 µL de Tn5 transposase e água Milli-Q num volume total de 10 µL. A reação foi incubada durante 2 h a 37 °C sendo após interrompida com a adição de 1 µL da solução EZ:TN *Stop Solution* seguido por aquecimento a 70 °C por 10 min. A estirpe de *E. coli* DH10B foi transformada com 1 µL da reação e as células foram crescidas a 37 °C por 36 h em meio LA contendo 100 µg/mL de canamicina.

Para seqüenciamento do plasmídeo pUC-LipA 96 clones derivados de pUC-LipA, contendo inserido aleatoriamente o cassete EZ-Tn5<KAN-2> foram coletados da placa com o marcador canamicina. O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxirribonucleotídeos (SANGER; NICKLEN; COULDON, 1977) e um sequenciador Automático de DNA (Applied Biosystems modelo 377). O sistema da reação de seqüenciamento (volume final de 8 µL) continha os seguintes componentes: 0,2 µg do plasmídeo pUC-LipA com transposon (purificado de acordo com o item 5.10), 10 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores KAN-2 FP-1 *Forward Primer* (5' - ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC - 3') e KAN-2 RP-1 *Reverse Primer* (5' - GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG - 3') (Epicentre), 4 µL de DYEnamic ET Terminator (Amersham Biosciences) e água Milli-Q. A reação foi realizada no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) com 34 ciclos consecutivos de 20 seg a 96 °C e 1 minuto e 30 seg a 60 °C.

O produto da reação de seqüenciamento foi precipitado a frio com adição de 32 µL de água Milli-Q, 2 µL de acetato de amônio 7,5M e 60 µL de isopropanol seguido de incubação a temperatura ambiente por 10 min e centrifugação durante 30 min. O precipitado de DNA foi lavado com etanol 80%, seco em estufa a 37 °C, dissolvido em 4 µL de tampão formamida, desnaturado (96 °C por 2 min) e submetido à eletroforese no seqüenciador automático ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

5.16 Análise dos mutantes LipA

Dos 96 clones derivados de pUC-LipA, contendo inserido aleatoriamente o cassete EZ-Tn5<KAN-2>, 48 foram coletados e plaqueados em meio para triagem da atividade lipolítica (item 5.8.1). Os clones que perderam a capacidade de formar halos de hidrólise foram analisados por seqüenciamento, conforme item anterior, para verificar a posição na qual o transposon foi inserido no plasmídeo.

5.17 Amplificação por PCR

Para superexpressão de LipA em *E. coli*, a ORF de 852 pb correspondente ao gene *lipA* foi amplificada a partir do plasmídeo pUC-LipA por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores *lipAFW* (GAGGTATAAGGATCCAAAAC) e *lipARV* (GGATTTCTAAGCTTGATTAG)

contendo os sítios de restrição *Bam*HI e *Hind*III, respectivamente (sublinhados). O sistema de reação para PCR foi composto por: 2 unidades de enzima Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen), 2 µL de tampão de reação 10x (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 10 pmol/µl de cada iniciador, 200 µmol/L de dideoxynucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1,5 mmol de cloreto de magnésio e água Milli-Q estéril para um volume de final de 20 µl. Como molde para a reação foi utilizado 50 ng do plasmídeo pUC-LipA. A reação foi realizada em termociclador Eppendorf Master Cycler Gradient 5331 nas seguintes condições: 1 ciclo 95°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 38°C por 30 seg, 72°C por 1 min; e 1 ciclo final de 72°C por 5 min.

O tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação foi monitorado em gel de agarose 1% (m/v) após coloração com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizado sob transiluminação UV.

5.18 Clonagem do gene *lipA* no vetor de expressão pET28b+

O vetor de expressão pET28b+ foi submetido à clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (Fermentas) durante 16 h a 37 °C. Após desnaturação das enzimas a 80 °C durante 15 min, o DNA foi precipitado com etanol absoluto seguido de lavagem com etanol 80%. O DNA foi seco e ressuspendido em água Milli-Q.

Para ligação do gene *lipA*, o amplificado foi tratado com as mesmas enzimas de restrição, que após digestão foram desnaturadas. O DNA foi precipitado e submetido a eletroforese em gel agarose LMP 0,8%. O DNA foi

purificado do gel agarose LMP 0,8% e ligado com 1U de T4 DNA ligase (Fermentas) com o plasmídeo pET28b+, de acordo com as especificações do fabricante.

5.19 Superexpressão da proteína LipA

Os plasmídeo pET28-LipA foi introduzido na estirpe de *E. coli* BL21(λ DE3)pLysS por eletroporação e as colônias transformantes foram mantidas em meio sólido LA com canamicina (50 μ g/mL) a 4 °C. Cinquenta mililitros de meio LB foram inoculados na proporção de 1/100 com uma cultura crescida durante a noite. As células foram cultivadas a 30 °C sob agitação até DO₆₀₀ de 0,5. Neste momento foi adicionado IPTG 0,5mM e a cultura foi incubada por 12 h a 18 °C sob agitação a 120 rpm. A cultura foi centrifugada a 5.000 x *g* por 5 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em 5 mL de tampão de sonicação (50 mM de tampão fosfato, pH 7,0). As células foram lisadas por sonicação por 6 ciclos de 15 seg e 30 seg de intervalo em banho de gelo. Durante o procedimento, o extrato celular foi mantido em banho de gelo. Após a lise celular, o extrato foi centrifugado a 10.000 x *g* por 10 min a 4 °C, as frações solúvel e insolúvel foram separadas e as proteínas foram analisadas por eletroforese em géis de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), como descrito por LAEMMLI (1970). Os géis foram corados com Coomassie Blue R-250.

5.20 Análise por espectrometria de massa

O preparo da amostra de proteína a partir do gel SDS-PAGE para análise de massa pela técnica de MALDI-ToF foi feito conforme o protocolo descrito por WESTERMEIER; NAVEN (2002).

Com auxílio de uma ponteira de 1.000 µL estéril foi cortado um fragmento do gel, cujo corante foi removido até descoloração total através de sucessivas lavagens com 30 µL de uma solução 75 mM de bicarbonato de sódio e etanol 40%. Em seguida, o fragmento de gel foi desidratado com 30 µL de acetonitrila 100% e secado em estufa a 30 °C. A digestão das proteínas foi feita com 10 µL de solução de tripsina (10 µg/ml) em tampão 40 mmol/L bicarbonato de amônio pH 8,0 contendo 10% de acetonitrila na estufa a 37 °C durante 14 h. Os peptídeos trípticos foram extraídos do gel com 30 µL de solução de extração (50% acetonitrila e 5% ácido trifluoracético) por 30 min a temperatura ambiente. As massas dos peptídeos trípticos foram determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI-ToF modelo Autoflex II (Bruker Daltonics) e os fragmentos de massa/carga (m/z) analisados com o programa FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics).

5.21 Ensaios de atividade lipolítica

5.21.1 Preparo do extrato de células

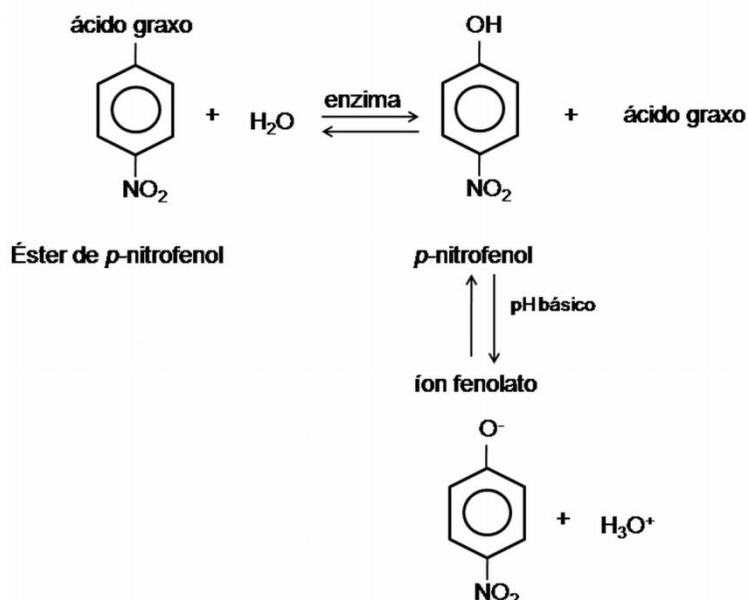
Para a determinação da atividade lipolítica foram utilizados extratos de *E. coli* DH5 α /pUC-LipA. Como controle, extratos de *E. coli* DH5 α /pUC19 foram preparados sob as mesmas condições. Dez mililitros de *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo recombinante pUC-LipA foram crescidos durante a noite em shaker a 37 °C, seguido de centrifugação a 5.000 x *g* por 10 min. O precipitado de células foi ressuspensionado em 5 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,0, seguido de sonicação em banho de gelo (5 ciclos de 15 seg com 30 seg de intervalo). O lisado de células foi centrifugado a 10.000 x *g* por 10 min e o sobrenadante foi recuperado para os ensaios de atividade utilizando ésteres de *p*-nitrofenila (pNP) como substrato.

5.21.2 Determinação da atividade lipolítica por micro-ensaio colorimétrico

A atividade foi determinada pelo método colorimétrico em microplacas de 96 poços utilizando substratos de *p*-nitrofenol (pNP) de acordo com Ruiz et al., (2004) com modificações (em relação ao volume total da reação, concentração final de pNP, tipo de tampão, volume adicionado de enzima, e presença de goma arábica com agente emulsificante). Esses substratos são formados pela molécula de pNP esterificada com um ácido graxo, que pode variar quanto o comprimento da cadeia carbônica. A hidrólise do éster faz com

que o pNP liberado absorva luz em condições alcalinas sob comprimento de onda na faixa de 415 nm. O aparecimento do produto amarelo na reação ocorre através da formação do íon fenolato (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999) (Figura 6).

Figura 6. Reação de hidrólise do éster-pNP e formação do íon fenolato.



O substrato éster de pNP foi dissolvido para uma concentração de 20 mM em isopropanol sob agitação em vórtex. Essa solução foi diluída 1:10 (v/v) no tampão de reação (66 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,6% Triton X-100, 0,1% goma arábica) sob agitação constante em vórtex até a formação de uma emulsão estável e clara. Cento e quarenta microlitros dessa mistura foram transferidos

para poços de uma microplaca de 96 poços seguido de incubação a 30 °C durante 10 min. Após, 70 µL da solução de enzima preparada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 previamente incubada durante 10 min a 30 °C, foram adicionados à mistura, dando início a reação num volume final de 210 µL.

A formação de pNP foi continuamente monitorada durante 20 min a 30 °C num leitor de microplacas Tecan Infinite M2000 a 415 nm. A absorbância correspondente aos controles (extrato de *E. coli* DH5α/pUC19, extrato *E. coli* DH5α/pUC-LipA fervido, controle do tampão de reação) foi subtraído da absorbância total obtida. A atividade foi determinada considerando a curva de calibração do pNP (Item 5.21.3). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de pNP por minuto de reação.

5.21.3 Curva de calibração e determinação da absortividade molar (ϵ L)

A curva de calibração para o pNP foi realizada em microplacas de 96 poços. Uma solução estoque de pNP (100 mM) foi preparada em isopropanol seguido do preparo de soluções padrão nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mM. Os padrões foram diluídos na proporção 1:10 com tampão de reação para um volume final de 1 mL. Destas diluições, 140 µL foram adicionados aos poços da microplaca e completados para 210 µL com 70 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. As absorvâncias foram lidas em um leitor de microplacas Tecan Infinite M2000 a 415 nm. O coeficiente de extinção molar do pNP foi calculado acordo com a equação $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, sendo “A” equivalente a

absorbância, “b” o caminho óptico e “c” a concentração molar de pNP . O valor de ϵ obtido foi de $0,154 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. O branco foi feito com isopropanol.

5.21.4 Determinação da especificidade ao substrato

A especificidade ao substrato foi determinada utilizando ésteres de pNP com cadeias de ácido graxo de diferentes tamanhos: pNP-acetato (C2), pNP-butirato (C4), pNP-valerato (C5), pNP-caproato (C6), pNP-caprato (C10), pNP-laurato (C12), pNP-miristato (C14), pNP-palmitato (C16) e pNP-estearato (C18). A atividade lipase do extrato solúvel de células foi determinada a 30°C em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0.

5.21.5 Determinação do pH ótimo

O pH ótimo para atividade de LipA foi determinado a 30°C utilizando pNP-butirato como substrato, na faixa de pH 3,0-11,0 utilizando os seguintes tampões: 50 mM acetato/acetato de sódio (pH 3,0-5,5), 50 mM MES (pH 5,5-7,0), 50 mM HEPES (pH 7,0-7,5), 50 mM glicina/NaOH (pH 7,5-11,0) e 50 mM Tris-HCl (pH 6,8-8,4). O coeficiente de extinção molar do pNP foi medido para cada um dos tampões no comprimento de onda de 348 nm (ponto isosbético do pNP) de acordo com a equação $A = \epsilon.b.c$, sendo “A” equivalente a absorbância, “b” o caminho óptico e “c” a concentração molar de pNP (Tabela 3).

Tabela 3. Coeficientes de extinção molar do pNP em diferentes valores de pH no comprimento de onda a 348 nm.

Tampão	pH	$\epsilon(\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1})$
Acetato/acetato de sódio	3	0,344
Acetato/acetato de sódio	4	0,360
Acetato/acetato de sódio	5	0,358
Acetato/acetato de sódio	5,5	0,359
MES	5,5	0,362
MES	6	0,369
MES	7	0,345
HEPES	7	0,352
HEPES	7,5	0,334
Glicina/NaOH	7,5	0,353
Glicina/NaOH	8	0,341
Glicina/NaOH	9	0,348
Glicina/NaOH	10	0,349
Glicina/NaOH	11	0,375

5.21.6 Determinação da temperatura ideal e termoestabilidade

O efeito da temperatura na atividade de LipA foi medida utilizando pNP-butirato como substrato e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 em temperaturas variando de 20-40°C. A termoestabilidade foi medida incubando o extrato bruto contendo LipA em várias temperaturas (20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C) durante 30 min. Após esse tempo as amostras foram colocadas em gelo durante 30 min e a atividade residual foi medida.

5.22 Análise de bioinformática

Para a análise de prováveis regiões codificantes foi utilizado o programa ORF finder (*Open Reading Frame Finder*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). A sequência deduzida de aminoácidos dos genes identificados no programa ORF finder através da ferramenta BLASTP (pertencente ao pacote de programas do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que foi comparada com a sequência de aminoácidos das proteínas depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A identificação e anotação dos domínios na sequência de aminoácidos das proteínas identificadas foram realizadas utilizando os programas CDD-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>), SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>) e PFAM (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>).

A ferramenta Compute pI/Mw, do servidor Expasy, foi utilizada para determinação do ponto isoelétrico (pI) e peso molecular teóricos. O programa ClustalW (1.82) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) foi utilizado para realização de alinhamento múltiplos das sequências de aminoácidos de proteínas. A predição de sequência peptídeo sinal em LipA foi realizada pelo programas SignalP 3.0 (NIELSEN *et al.*, 1997). A análise filogenética foi feita com a ferramenta MegAlign, do pacote de programas Lasergene (DNASar Inc.). A comparação com o banco de dados RDP II foi feita através dos programas Classifier e Sequence Match (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

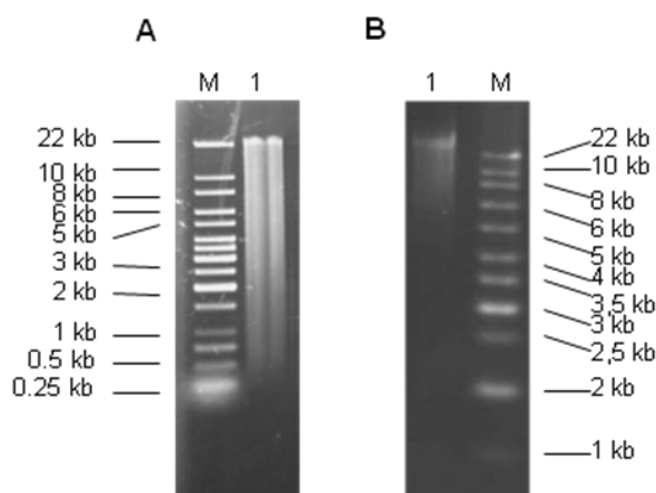
6.1 Isolamento de DNA de solo de mangue

O solo de um manguezal apresenta características particulares em comparação com outros tipos de solo, pois tem origem fluvial e marinha, resultado dos processos hidrodinâmicos entre o estuário e o mar aberto, respectivamente. De acordo com análise realizada da amostra coletada numa profundidade de 5 cm, o solo apresentou pH 6,5 sendo constituído por areia fina-muito fina (85,6% do peso total, partículas entre 0,250-0,062 mm), silte (4,1% do peso total, partículas entre 0,062-0,004 mm) e argila (10% do peso total, partículas <0,004 mm). Como era esperado, foi constatada alta quantidade de matéria orgânica (7,06%) no horizonte coletado. Antes da extração de DNA foi introduzida uma etapa de lavagem do solo com tampão fosfato visando promover a dispersão das partículas do solo, diminuir a quantidade de compostos orgânicos, metais, contaminantes e DNA extracelular danificado (HE; XU; HUGHES, 2005).

Embora existam vários estudos publicados sobre métodos de extração de DNA em vários tipos de ambientes, pouco se conhece em relação à extração de DNA a partir de solo de mangue. Alguns métodos diretos de extração foram testados, como o método de extração direta segundo Zhou; Bruns; Tiedje (1996). Porém, apesar do bom rendimento, o DNA extraído estava muito fragmentado, apresentando baixa massa molecular com

fragmentos de no máximo 20 kb, e sua solução com uma coloração marrom-escura, indicou co-extração de substâncias húmicas (Figura 7). A obtenção de fragmentos entre 25-40 kb é necessário para empacotamento no fago lambda. Com o método de extração indireto, descrito por Hardeman e Sjöling (2007), foi possível a obtenção de DNA metagenômico pouco fragmentado e com bom rendimento a partir de sedimento marinho. Esse mesmo protocolo foi utilizado neste trabalho.

Figura 7. Comparação do DNA extraído pelo método direto e indireto a partir do solo do mangue.

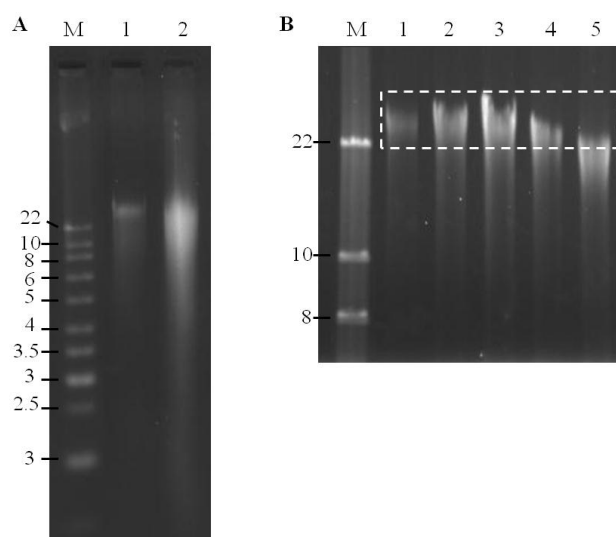


Eletroforese em gel agarose 1% (m/v) do DNA metagenômico extraído de solo de mangue pelo método direto (A) e indireto (B). Linha M: marcador de massa molecular indicado em kb (GeneRuler 1 Kb ladder-Fermentas com vetor pLARF 3.18 digerido com *Bam*HI); linha 1(A): 0,5 µg de DNA extraído pelo método direto; linha 1(B): 0,25 µg DNA extraído pelo método indireto. O DNA foi corado com brometo de etídeo.

Conforme as Figuras 7B e 8A, a distribuição do tamanho das moléculas de DNA obtidas no método de extração indireta está compreendida na faixa de 22 kb e menos fragmentado. Com relação à pureza, foi verificada, num nível menor em relação à extração direta, a co-extração de substâncias húmicas. Como já mencionado, as substâncias húmicas interferem com os procedimentos de clonagem, pois inibem reações enzimáticas: digestão por enzimas de restrição, amplificação por Taq DNA polimerase, ligações e transformações (TSAI; OLSON, 1992; TEBBE; VAHJEN, 1993).

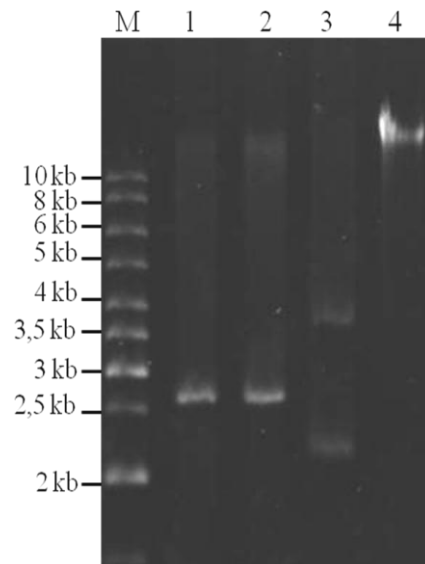
Para remoção desses contaminantes e também para seleção fragmentos de alta massa molecular apropriados para clonagem em foscímideo, o DNA foi purificado por eletroforese em gel agarose LMP (Figura 8B). Após duas corridas eletroforética, o DNA foi recuperado do gel num tamanho desejado e sem a presença de contaminantes visíveis. Testes de digestão com diferentes enzimas de restrição confirmaram que o DNA purificado após eletroforese estava suficientemente puro para continuidade dos procedimentos de clonagem (Figura 9). Um rendimento de 528 ng de DNA por grama de solo (peso úmido) foi obtido após a etapa de purificação.

Figura 8. Isolamento e purificação de DNA do solo de mangue.



(A) Eletroforese em gel agarose 1% (m/v) do DNA metagenômico de solo de mangue. Linha M: marcador de massa molecular indicado em kb (GeneRuler 1 Kb ladder-Fermentas com vetor pLARF 3.18 digerido com *Bam*HI); linha 1 e 2: 0,25 µg e 0,5 µg, respectivamente, de DNA isolado pelo método indireto. (B) Eletroforese em gel agarose LMP 0,8% realizada para purificar e selecionar fragmentos de DNA de alta massa molecular por eletroforese em gel agarose LMP 0,8%. Linha M: marcador de massa molecular indicado em kb (GeneRuler 1 Kb ladder-Fermentas com vetor pLARF 3.18 digerido com *Bam*HI); linha 1-5: migração das bandas de DNA cortadas no sentido decrescente de tamanho após duas corridas eletroforéticas. A linha pontilhada indica o DNA de alta massa molecular purificado do gel LMP para ligação no vetor pCC2FOS. O DNA foi corado com brometo de etídeo.

Figura 9. Ensaio de restrição com DNA purificado por eletroforese em gel de agarose.



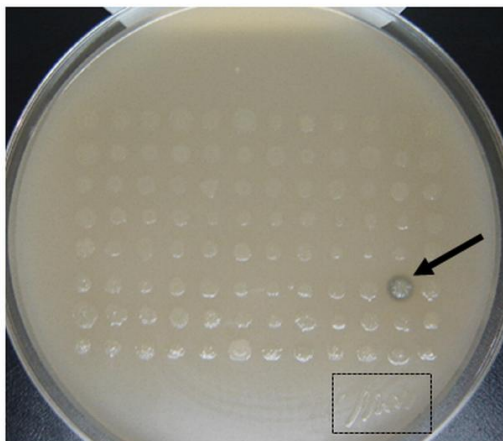
Eletroforese em gel agarose 1% (m/v) de um ensaio de restrição com DNA metagenômico de solo de mangue. Linha M: marcador de massa molecular indicado em Kb (GeneRuler 1 Kb ladder-Fermentas); linha 1: 0,25 μ g de DNA de solo de mangue purificado + 0,25 μ g de pUC19 digeridos com 5U de *EcoRI* durante 30 min a 37 °C; linha 2: 0,25 μ g de DNA de solo de mangue purificado + 0,25 μ g de pUC19 digeridos com 5U de *HindIII* durante 30 min a 37 °C; linha 3: 0,25 μ g de pUC19; linha 4: 0,25 μ g de DNA de solo de mangue purificado.

6.2 Construção e triagem da biblioteca metagenômica

O DNA isolado a partir do solo de mangue foi utilizado para construir uma biblioteca metagenômica compreendendo 2.400 clones que foram mantidos em *E. coli* EPI300-T1R. Análise de restrição com a enzima *EcoRI* realizada com 24 clones selecionados da placa aleatoriamente dentro da biblioteca metagenômica, revelou um padrão de restrição diferente para cada clone, com insertos de tamanho variando entre 22 a 30 kb. Com objetivo de verificar a presença de novos genes que codificam para enzimas hidrolíticas (lipases ou esterases, amilases, proteases, carboximetilcelulases e celulases), uma série de triagens em meio sólido com todos os 2.400 clones da biblioteca metagenômica foi realizada (Item 5.8 dos Materiais e Métodos).

Dentre todos os clones testados, um deles, nomeado pCC2-Lip, apresentou atividade em meio sólido com tributirina através da formação de um halo de hidrólise ao redor da colônia (Figura 10). Para confirmar se o foscímico era de fato responsável pela atividade observada, foi realizada nova triagem utilizando o mesmo substrato com o foscímico pCC2-Lip agora transformado em *E. coli* DH5 α . A atividade em meio sólido foi novamente constatada, sugerindo que o gene presente no foscímico estava codificando para uma enzima lipolítica. A tributirina, um triglicerídeo constituído por três cadeias de ácidos graxos com quatro carbonos de comprimento cada, ligados a molécula de glicerol por uma ligação éster. Como os ácidos graxos possuem 4 carbonos, o método pode identificar esterases e lipases (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Figura 10. Expressão da lipase no clone pCC2-Lip em *E. coli* EPI300-T1R.



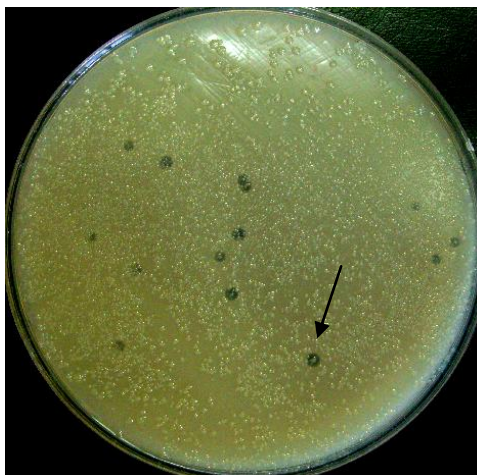
Exemplo de triagem realizada em placas com meio LB ágar contendo 1% tributirina, 0,1% goma arábica, 12,5 µg/mL cloranfenicol e 0,001% arabinose. 96 clones da biblioteca são mostrados. O clone com halo de hidrólise está indicado por uma seta. Como controle (área pontilhada), o foscímideo pCC2FOS foi transformado em *E. coli* EPI300-T1R. As placas foram incubadas durante cinco dias em estufa a 37 °C.

6.3 Análise da sequências do inserto do plasmídeo pUC-LipA

Visando identificar e obter a sequência do gene responsável pela atividade lipolítica, uma sub-biblioteca de aproximadamente 500 clones contendo pequenos insertos de DNA (~5 kb) foi construída no plasmídeo pUC19. Os clones foram testados da mesma forma para atividade em tributirina e um clone positivo, denominado pUC-LipA, com um halo de hidrólise bem

visível, foi selecionado para o seqüenciamento de DNA mediado por transposon (Figura 11). Para isso, uma minipreparação do plasmídeo do clone pUC-LipA serviu como substrato para uma reação *in vitro* na qual o transposon EZ-Tn5<KAN-2> foi inserido aleatoriamente no plasmídeo dos clones resultantes da reação (Item 5.15 dos Materiais e Métodos).

Figura 11. Triagem da sub-biblioteca metagenômica para atividade lipolítica.

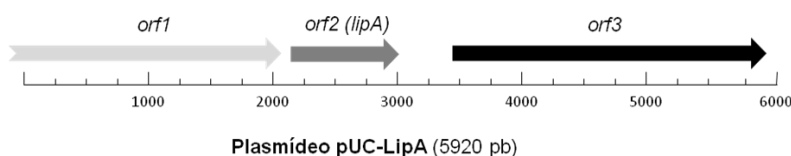


Triagem realizada em placas com meio LB ágar contendo 1% tributirina, 0,1% goma arábica e 200 µg/mL de ampicilina. O clone com halo de hidrólise selecionado para o seqüenciamento mediado por transposon está indicado por uma seta. A placa foi incubada durante 2 dias em estufa a 37°C.

Na análise da sequência nucleotídica do inserto (aproximadamente 5,9 kb) foram identificadas três regiões codificadoras de proteínas (*ORFs*) (Figura 12): *orf1*, que apesar de incompleta, apresenta região C-terminal similar a uma adenilato/guanilato ciclase da bactéria redutora de sulfato *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01 (YP_002430692) (68% similaridade, 49% identidade); *orf2*, que codifica para uma proteína similar a uma lipase isolada de uma biblioteca metagenômica (ACJ13070) (67% similaridade, 52% identidade); e *orf3*, que codifica para uma proteína similar a KP-43 peptidase da actinobactéria do solo *Arthrobacter* sp. FB24 (YP_832954) (64% similaridade, 49% identidade). As *orfs* 1 e 3 codificam proteínas (adenilato/guanilato ciclase e peptidase) similares de bactérias Gram positivas comumente associadas a degradação de compostos aromáticos em áreas contaminadas (SO; YOUNG, 1999; JOYNT *et al.*, 2006).

Através da inserção *in vitro* do transposon EZ-Tn5<KAN-2> no plasmídeo pUC-LipA, foram obtidos clones mutantes. Em alguns clones verificou-se a perda completa para atividade em meio com tributirina. Quando estes foram sequenciados utilizando os oligonucleotídeos do cassete do transposon, verificou-se que a inserção ocorria sempre na sequência compreendendo a lipase, confirmando desta forma que o gene era realmente responsável pela atividade e portanto funcional. O gene que codifica para uma lipase foi denominado *lipA*.

Figura 12. Mapa físico do plasmídeo pUC-LipA expressando atividade lipolítica.



Três *ORFs* com domínios conservados e similaridade com genes anotados foram identificados: *orf1* (parcial): codifica para uma proteína similar a uma adenilato/guanilato ciclase de *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01 (YP_002430692) (68% similaridade, 49% identidade, E value 2^{-142}), *orf2*: codifica para uma proteína similar a uma lipase obtida de uma biblioteca metagenômica (ACJ13070) (67% similaridade, 52% identidade, E value 1^{-72}); e *orf3*: codifica para uma proteína similar a KP-43 peptidase de *Arthrobacter* sp. FB24 (YP_832954) (64% similaridade, 49% identidade, E value 4^{-173}). A análise foi realizada com os programas ORF finder e BLASTP.

O gene *lipA* possui tamanho de 852 pb e codifica para uma proteína de 283 resíduos de aminoácidos com um massa molecular e um pI estimados de 32.252 Da e 5,95, respectivamente. A montante do códon de início TTG foi localizada provável região promotora CGGACAT - N13 - TATAAG relacionada a sequência consenso do promotor -10/-35 (Apêndice 1). Isso indica que o gene *lipA* foi transcrito a partir do seu próprio promotor, que foi funcional em *E. coli*. A jusante do gene *lipA* foi localizada uma região rica em GC seguida por uma sequência rica em TA, sugerindo que a terminação de transcrição do gene *lipA* ocorra de maneira independente do fator *rho*. Não foi encontrada

seqüência peptídeo sinal potencial, sugerindo que LipA seja uma proteína citoplasmática e não secretada.

Uma análise da seqüência de aminoácidos de LipA com o banco de proteínas não redundantes do NCBI, mostrou que LipA está relacionada (52% de identidade) com uma lipase obtida também por metagenômica - reator de lodo ativado (GenBank accession no. ACJ13070) (Tabela 4 e Figura 13). Baixa identidade foi encontrada em relação a outras lipases ou esterases de microrganismos conhecidos tais como: lipase do fungo *Aspergillus clavatus* NRRL 1 e uma lipase da bactéria *Gemmata obscuriglobus*, representante da família *Planctomycetales* que possui nucleóide envolto por membrana. Esta bactéria tem servido como modelo para estudo da origem evolutiva do núcleo nos eucariotos (LEE; WEBB; FUERST, 2009). O alinhamento da proteína LipA isolada do metagenoma do solo de mangue em relação as proteínas similares do banco do NCBI está mostrado na Figura 14.

Análise da seqüência de aminoácidos identificou diferentes combinações de regiões funcionais, tais como: domínios compreendendo enzimas com dobramento α/β hidrolase cuja função catalítica envolve uma serina, glutamato ou aspartato e uma histidina, formando a tríade catalítica (Abhydrolase_1, pfam00561; DU676, pfam05057; LipA, pfam COG1075, PGAP1, pfam07819) (OLLIS *et al.*, 1992; NARDINI; DIJKSTRA, 1999), domínio compreendendo a classe de lipases de *C. elegans* (Lipase_2, pfam) (DARTOIS *et al.*, 1992), colesterol acyltransferases envolvidas no metabolismo extracelular de lipoproteínas (LACT, pfam02450) (WANG *et al.*, 1997) (Figura 15).

Tabela 4. Comparação da proteína LipA isolada do metagenoma do solo de mangue com suas proteínas homólogas^a.

Proteína	Fonte	No. acesso no GenBank	Identidade % ^b	Referência
LipA	Metagenoma de solo de mangue	-	-	Este estudo
Lipase	Metagenoma de lodo ativado	ACJ13070	52	Não publicado
Proteína hipotética	<i>Podospora anserina</i> DSM 980	XP_001903948	27	Não publicado
Sítio ativo da família das esterases/lipases/ thioesterases	<i>Gemmata obscuriglobus</i> UQM 2246	ZP_02733109	31	Não publicado
YALI0E31515p	<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB122	XP_504639	31	DUJON <i>et al.</i> , 2004
Provável triacilglicerol lipase	<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	XP_001272340	26	Não publicado
Proteína hipotética	<i>Gibberella zeae</i> PH-1	XP_390196	25	Não publicado
Proteína hipotética	<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255	XP_002568242	27	VAN DER BERG <i>et al.</i> , 2008
Triacilglicerol lipase	<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	XP_746728	25	NIERMAN <i>et al.</i> , 2005

^a Em relação aos maiores *hits* na análise de LipA com o programa BLASTP.

^b A identidade na sequência de aminoácidos foi calculada a partir do pareamento obtido pelo programa ClustalW (CHENNA *et al.*, 2003).

Figura 13. Alinhamento da proteína LipA isolada do metagenoma do solo de mangue com sua proteína similar mais próxima no banco do NCBI.

```

LipA          MKTKKTYPIILAHGIARFDAGWNELIQLDNQDDPFLDMFHYFRGIRTMLLNRGFSVYHSS 60
Lipase (ACJ13070)  ----MSYPIVLAHGICRFDVLWNTALRVDDTDDVTLDLHYFRGIRTMLRRRGHRVYHSR 56
                  :***:*****.***. **  ::*: **  ** :*****.***. ****

LipA          VPWADEVDRRAEQLRKNVRNVLEQTGAEKVNIIAHSMGGGLDARHMLFNDRNKGKIHEKIA 120
lipase (ACJ13070) VAFGAKVDTRAAQLGTNVQRILSDTRAAKVNIIAHSMGGGLDARHLLFNDRDHGRIHERIA 116
                  *.:. :** ** *.**:.*:.* * *****:*****:*.***:**

LipA          SLTTIGTPHLGTSFADKGISEHGELIDILKRLSLNIEGVRDLTRDACTIFNDNSEVKAFE 180
lipase (ACJ13070) SLTTISTPHAGSPFADWGLQQFPNLTTLLRKVLVDVEGLHDLTTTACRSFNEQPEVQAFE 176
                  *****.*** *:*** *:.. :*  :*: :*:*** ** **:*.***:**

LipA          DELQTNIELRAYTGSADIGNVLAILRTPYRIIKEEEGDNDGLVSVSSALWQRAKHTGIWK 240
Lipase (ACJ13070) GECERTIRFQTYAGRQSRAGIFLPLQPSFDIIQAAEGDNDGLVSVRSARWQDRYFKGVLE 236
                  .* : .*:***:* . .: :*..: **: ***** ** ** ..*: :

LipA          DADHLNELAWWDFQAQGT-EGFLSLTKRIHHKYLEIARELPEIF 283
lipase (ACJ13070) NADHLNELAHWDGSQRHTGETSVELRSRVHAFYAAIAAELP--- 277
                  :***** ** :* * * :.* .*: * ** **

```

Alinhamento global obtido através do programa ClustalW de LipA (lipase isolada do metagenoma do solo de mangue e ACJ13070 (lipase obtida também por metagenômica em reator de lodo ativado). O pentapeptídeo conservado Ala-X-Ser-X-Gly encontra-se sublinhado e em negrito. Os aminoácidos idênticos estão marcados abaixo das seqüências com asteriscos e os sinais (:) e (.) indicam aminoácidos de grupos semelhantes.

Figura 14. Alinhamento da proteína LipA isolada do metagenoma do solo de mangue com proteínas similares do banco do NCBI.

```

LipA      -----
ACJ13070  -----
XP_001903948  MSSLVCRSPSVISTSLTLP LLRLAASARSVQPCAQRQPQPQARQASGPVAVRRFSASL 60
XP_504639    -----MLAMRPIRHRLGPNLLRPLH-----TTSL 24
ZP_02733109  -----
AAV86757     -----MAKSMRSRVMAG-----AVAC 16
BAA22231     -----MKFVKRR----- 7

LipA      -----MKTKKTYPIILAHGFIARFDAGWNELIQLDN 30
ACJ13070    -----MSYPIVLAHGICRFDVLWNTALRVDD 26
XP_001903948  TLSRKVAPTEAAHINEVRKTIAD EFALIKDAYQSPKHPVVLAHGLLGFAELK----- 112
XP_504639    RLS-----EPRIIENDFATLRDKYNAPKWPVVLCHGLCGFNEID----- 63
ZP_02733109  -----MTANDIPQLG-----APIVLVHGLCGYDRVT----- 26
AAV86757     AMSVAPFAGTTALTTLATTHAAMAATAPADDYATTRYPIILVHGLTGTDKYAG----- 69
BAA22231     -----IIALVTILMLSVTSLFALQPSAKAAEHNPVVMVHGIGG----- 45
                                     *::: **:

LipA      QDDPFLLDMFHYFRGIRTM LLNRGFSVYHSSVP---WADEVDRRAEQLR----- 75
ACJ13070    TDDVTLDLHYFRGIRTM LRRRGHRVYHSRVA---FGAKVDTRAAQLG----- 71
XP_001903948  LAGSYLPSIHYWRGIQEALTAQGA EVITASVP---PSGSIEKRAAKLA----- 157
XP_504639    THLPVLPTYEYWGGIKESLEGAGATVITTAVP---PVSSIKERAETLAGSLTQILHDAPW 120
ZP_02733109  AFG--RPLKDYFPGIRPQLEASGNRVLM PRLS---CTRGVAERAGELK----- 69
AAV86757     -----VLDYWYGIQEDLQQHGATVYVANLSGFQSDDGPNRGEQLL----- 110
BAA22231     -----ASFNFAGIKSYLVSQGWSRDKLYAVDFWDKTGTNYNNGPVLS----- 87
                                     : **: * *
                                     .   :

```

LipA	--KNVRNVLEQTGAEKVNI	IAHSMGGLDARHMLFNDRNKGKIEKIASLTTIGTPHLGTS	133
ACJ13070	--TNVQRILSDTRA	AKVNI	IAHSMGGLDARHLLFNDRDHGR
XP_001903948	-QDIEAQAQGS----	VNV	IAHSMGGLDARYMISQLR--PKG-VDVKS
XP_504639	KKDTEKKSQQDKEEPKVN	L	IAHSMGGLDSRYLIHNLA--KDL
ZP_02733109	-RYLLANVPSGP----	VHL	IGHSMGGLDARYMISHLG--MAD--RVRT
AAV86757	--AYVKTVLAATGATKVN	L	VGH
BAA22231	--RFVQKVLD	ETGAKKVDI	VAHSMGGANTLYYIKNLD----GGNKVANV
			TLGGANR---
			138

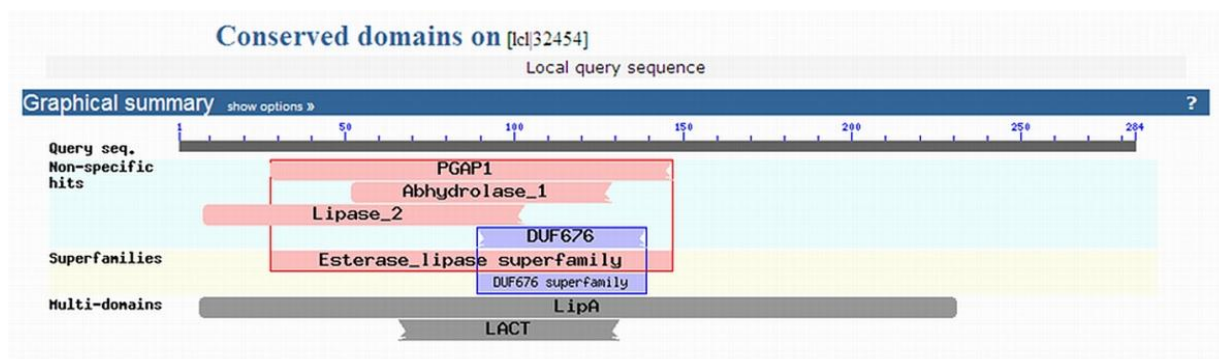
* . : . . * * * * : : : . . * : . . :

LipA	FADKGISEHGELIDILK-RLSLNIEGVRDLTRDACTIFND-----	NSEVKAFEDE	182
ACJ13070	FADWGLQQFPNLTTLLR-KVLVDVEGLHDLTTTACRSFNE-----	QPEVQAFEGE	178
XP_001903948	FADYLIDELGPDY--LP-QVYKAWERV	TGWEPSAFS	QLTQ-----KYMAEHFNPA
XP_504639	FADWCFDELGDKN--VD-RLYTILETLGVQNP	DGFKQLTT-----TYLKE-FNKT	224
ZP_02733109	FADWGLKRFGG-----LLAPFFQLLGLSTQAFFDLTS-----	AVCAR-FNAT	161
AAV86757	FADFVQDVLAYDPTELSSTVYAAFVN	VFGILTSSSHNTNQDALASLKT	LTTLTAQAATYNQN
BAA22231	-----LTTGKALPGTDPNQKILYTS-----		158

: .

LipA	LQTN-----	IELRAYTGSADI-----	198
ACJ13070	CERT-----	IRFQTYAGRQSR-----	194
XP_001903948	TPDD-----	PNVQYFSYGAMVNG-----	274
XP_504639	TQND-----	PDVAYYSYGAQY-----	240
ZP_02733109	VRDV-----	PGVRYFSVAGVCD-----	178
AAV86757	YPSAGLGAPGSCQTGAPTETVGGNTHLLYSWAGTAIQPTLSLFGVTGATDTSTVPVVDPA		282
BAA22231	-----		

Figura 15. Domínios conservados de LipA.



Motivos funcionais conservados obtidos pela análise com o banco de dados do Pfam. Motivo *PGAP1 like protein*: proteína do retículo endoplasmático com motivo contendo serina catalítica, *Abhydrolase_1*: enzimas com dobramento α/β hidrolase, *Lipase_2 (class 2)*: família formada por proteínas e lipases do organismo *C. elegans*, *DUF676*: provável serina esterase, *LipA*: acetiltransferases com dobramento α/β hidrolase, *LACT*: colesterol acetiltransferase.

Nas lipases, a serina nucleofílica encontra-se em um pentapeptídeo conservado Gly-X-Ser-X-Gly. No entanto, em LipA foi encontrado o padrão Ala⁹⁴-His⁹⁵-Ser⁹⁶-Met⁹⁷-Gly⁹⁸, no qual um resíduo de alanina substitui a primeira glicina. Esse motivo é encontrado em um pequeno grupo de lipases bacterianas agrupadas nas subfamílias I.4 e I.5, correspondentes a membros mesofílicos e termofílicos pertencentes ao gênero *Bacillus*, respectivamente (ARPIGNY; JAEGER, 1999).

A função potencial desse motivo estrutural foi verificada por Eggert e colaboradores (2001) através da construção variante Ala76Gly (primeiro resíduo do pentapeptídeo) em LipB por mutação sítio dirigida, revertendo assim o motivo canônico conservado. A comparação das atividades de LipB selvagem com a variante A76G mostrou que a lipase mutada é mais sensível a temperatura (meia-vida de 8 min a 45 °C) enquanto que o tipo selvagem permaneceu estável. A variante A76G apresentou especificidade ao substrato semelhante à selvagem, possuindo atividades máximas com ésteres de pNP com cadeia entre C8 e C14, porém com um decréscimo de 50% em relação a atividade específica. Uma diferença marcante foi observada na maior capacidade da variante A76G em hidrolisar monoacilgliceróis (1-monocapriloilglicerol, C18:0 e mono-oleína, C18:1) (EGGERT *et al.*, 2001).

Apesar da semelhança do motivo pentapeptídeo com lipases das subfamílias I.4 e I.5, baixa semelhança foi encontrada quando alinhamento global da sequência foi considerado (Tabela 5). Além disso, uma análise computacional com a ferramenta Compute pI/Mw, mostrou que LipA é uma proteína com carácter mais ácido e possui maior massa molecular que as lipases da subfamília I.4; e menor peso molecular em comparação com membros da subfamília I.5, apesar dos valores semelhantes do pI.

Visando classificar LipA, foi construída uma árvore filogenética com base na comparação da sequência de aminoácidos de LipA e sua homóloga (ACJ13070) com 35 enzimas lipolíticas representando 9 diferentes famílias (ARPIGNY, JAEGER, 1999; LEE *et al.*, 2006) (Figura 16). O dendograma mostra que LipA e sua similar (ACJ1307) formam um grupo único, num ramo

separado das famílias I.4, I.5 e I.6 e de outras lipases. Todavia o ramo tem origem a partir da família I, sugerindo que LipA e sua similar (ACJ13070) pertençam a uma nova subfamília dentro das lipases verdadeiras. A posição das outras lipases na árvore foi de acordo com a classificação de Arpigny e Jaeger (1999).

Tabela 5. Comparação entre LipA e lipases do gênero *Bacillus*.

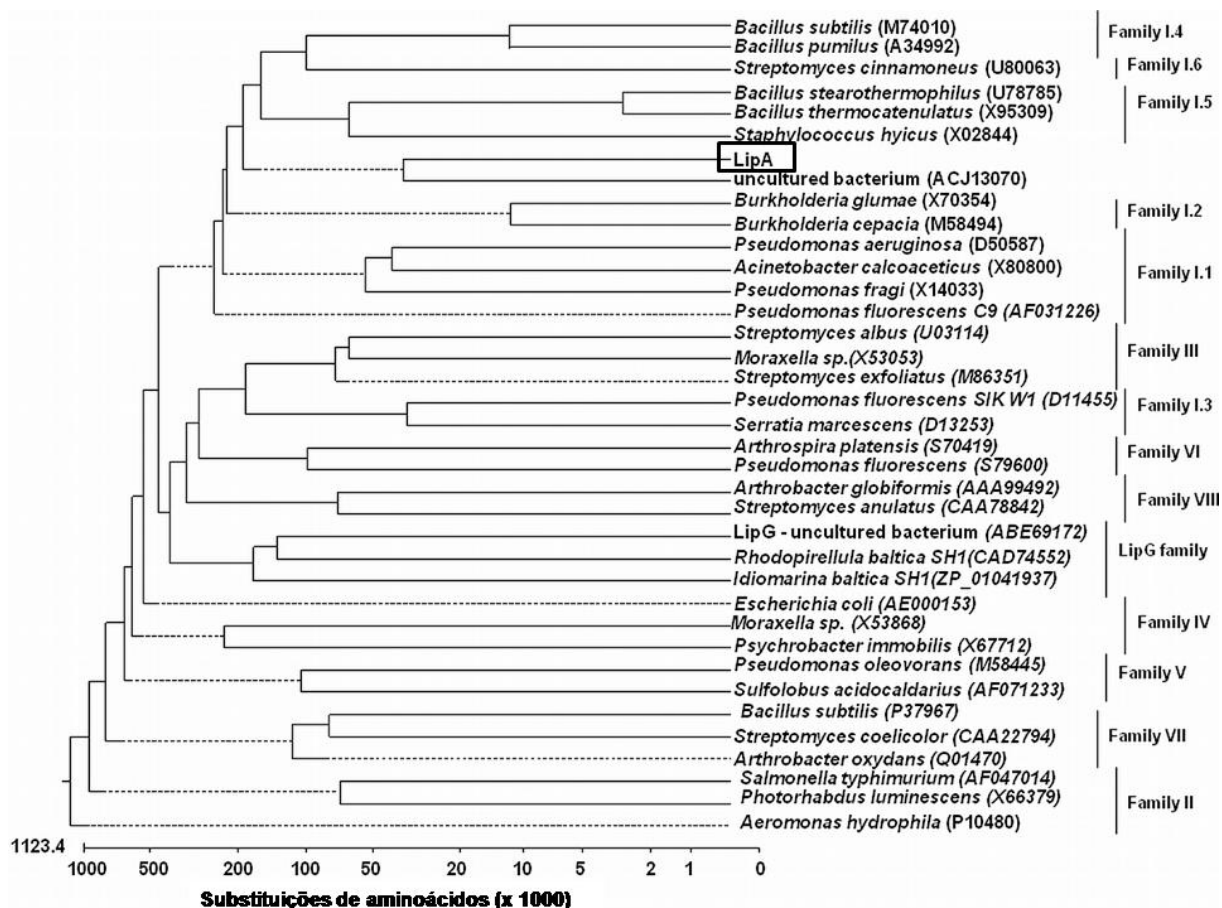
Lipase ou esterase - Organismo	Similaridade alinhamento global (%) ^a	Sequência do pentapeptídeo conservado ^b	Peso molecular (kDa)/ pI ^c	No. de acesso no GenBank
LipA - metagenoma	100	A - H - S - M - G	32.2/5.95	Este estudo
Lipase - metagenoma	52,9	A - H - S - M - G	31.3/6.7	ACJ13070
LipA - <i>B. subtilis</i>	18,8	A - H - S - M - G	22.8/9.72	M74010
LipB - <i>B. subtilis</i>	18,8	A - H - S - M - G	22.3/9.43	C69652
Lipase - <i>B. licheniformis</i>	18,2	A - H - S - M - G	22.7/9.70	AJ297356
Lipase - <i>B. stearothermophilus</i>	20,8	A - H - S - Q - G	46.2/6.43	U78785
Lipase - <i>B. thermocatenulatus</i>	20,8	A - H - S - Q - G	46.2/6.68	X95309
Motivo consenso das lipases bacterianas		G - X - S - X - G		

^a Identidade referente ao alinhamento global das pré-proteínas em relação a LipA (metagenoma) determinada com o programa MegAlign, DNA-Star (Lasergene).

^b Aminoácidos conservados do pentapeptídeo consenso estão marcados por uma linha pontilhada.

^c PM and pI correspondem a sequência da pré-proteína.

Figura 16. Árvore filogenética de LipA do metagenoma do solo do mangue e outras lipases bacterianas.



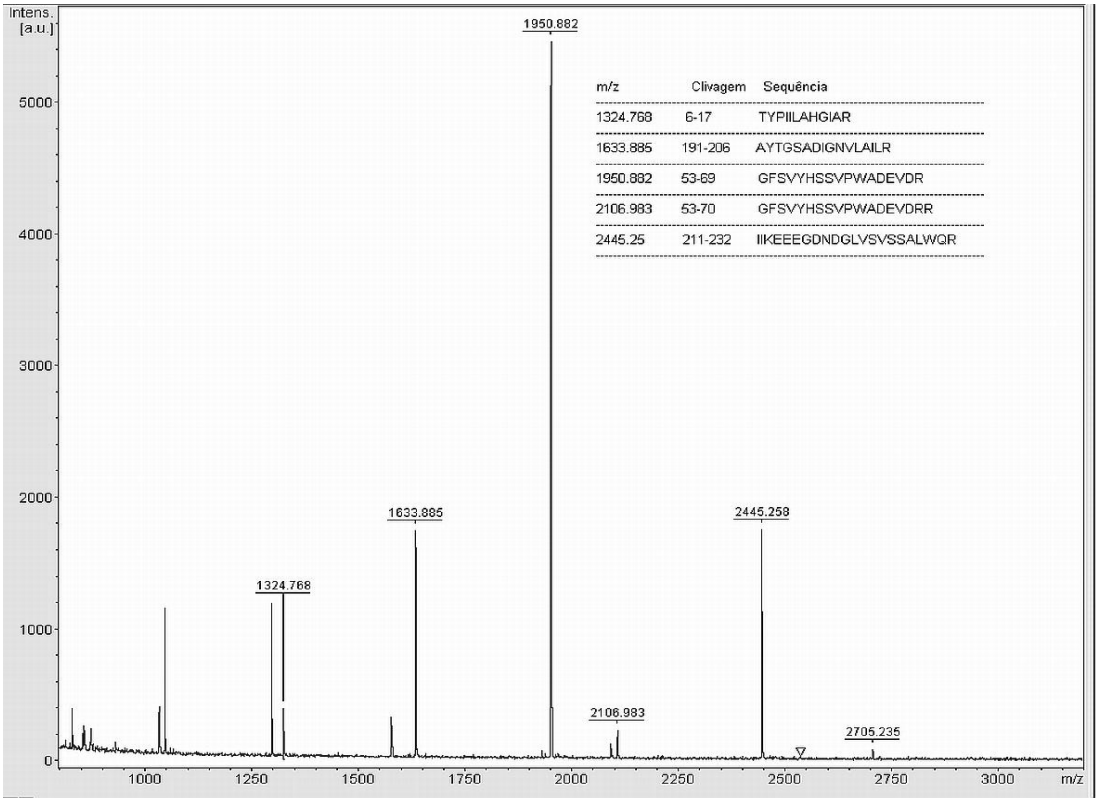
A análise foi baseada na sequência de aminoácidos de LipA com outras 35 enzimas lipolíticas representando 9 diferentes famílias. As famílias foram definidas de acordo com Arpigny e Jaeger (1999) e Lee e colaboradores (2006). O dendograma foi construído pelo método *neighbor-joining* utilizando o programa MegAlign do pacote DNA-Star (Lasergene). A escala indica o número de substituições de aminoácidos por sítio.

6.4 Superexpressão da proteína LipA em *E. coli*

O objetivo de caracterizar a enzima identificada pela abordagem metagenômica foi de investigar sua especificidade da lipase quanto a capacidade de hidrolisar ésteres de pNP com ácidos graxos de diferentes comprimentos na cadeia carbônica, e verificar a temperatura e pH no qual a atividade enzimática é máxima. Para isso, o gene *lipA* foi amplificado, clonado no vetor de expressão pET28b+, e superexpresso em *E. coli* BL21(λDE3)pLysS. Uma análise por espectrometria do tipo MALDI-ToF foi realizada com uma amostra obtida a partir de um fragmento retirado do SDS-PAGE correspondendo a uma banda superexpressa na faixa de 32 kDa. Os dados provenientes dos espectros das massas tríplicas confirmaram que a banda superexpressa correspondia de fato a LipA (Figura 17).

No entanto, a proteína LipA superexpressa foi encontrada presente totalmente na fração insolúvel do lisado celular na forma de corpos de inclusão (Figura 18). Os corpos de inclusão são resultados da acumulação intracelular de proteínas dobradas parcialmente ou dobradas incorretamente formando agregados protéicos insolúveis e sem atividade.

Figura 17. Identificação de LipA por espectrometria de massa MALDI-ToF.



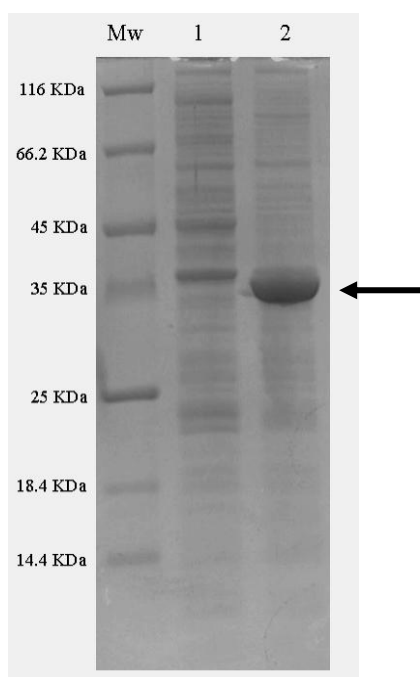
1	TTG	AAA	ACA	AAA	AAA	ACT	TAT	CCA	ATT	ATT	CTT	GCT	CAC	GGT	ATT	45
1	Leu	Lys	Thr	Lys	Lys	Thr	Tyr	Pro	Ile	Ile	Leu	Ala	His	Gly	Ile	15
46	GTC	AGG	TTC	GAT	GCG	GGC	TGG	AAT	GAA	CTT	ATC	CAG	CTG	GAT	AAC	90
16	Val	Arg	Phe	Asp	Ala	Gly	Trp	Asn	Glu	Leu	Ile	Gln	Leu	Asp	Asn	30
91	CAG	GAT	GAT	CCC	TTT	TTG	GAT	ATG	TTC	CAT	TAT	TTT	CGT	GGT	ATT	135
31	Gln	Asp	Asp	Pro	Phe	Leu	Asp	Met	Phe	His	Tyr	Phe	Arg	Gly	Ile	45
136	CGG	ACG	ATG	CTT	CTT	AAC	CGT	GGT	TTC	TCA	GTT	TAT	CAT	TCG	AGT	180
46	Arg	Thr	Met	Leu	Leu	Asn	Arg	Gly	Phe	Ser	Val	Tyr	His	Ser	Ser	60
181	GTC	CCT	TGG	GCC	GAT	GAA	GTG	GAT	AGA	CGC	GCC	GAG	CAA	TTA	AGA	225
61	Val	Pro	Trp	Ala	Asp	Glu	Val	Asp	Arg	Arg	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	75
226	AAG	AAC	GTG	CGG	AAC	GTG	CTC	GAA	CAG	ACG	GGT	GCT	GAA	AAA	GTA	270
76	Lys	Asn	Val	Arg	Asn	Val	Leu	Glu	Gln	Thr	Gly	Ala	Glu	Lys	Val	90
271	AAC	ATC	ATT	GCG	CAC	AGT	ATG	GGG	GGG	CTT	GAC	GCG	CGT	CAT	ATG	315
91	Asn	Ile	Ile	Ala	His	Ser	Met	Gly	Gly	Leu	Asp	Ala	Arg	His	Met	105
316	CTT	TTT	AAT	GAC	CGA	AAC	AAA	GGC	AAG	ATT	CAC	GAA	AAA	ATA	GCC	360
106	Leu	Phe	Asn	Asp	Arg	Asn	Lys	Gly	Lys	Ile	His	Glu	Lys	Ile	Ala	120
361	TCT	CTG	ACC	ACC	ATT	GGG	ACA	CCT	CAC	CTT	GGT	ACC	TCA	TTT	GCG	405
121	Ser	Leu	Thr	Thr	Ile	Gly	Thr	Pro	His	Leu	Gly	Thr	Ser	Phe	Ala	135
406	GAC	AAG	GGG	ATT	AGT	GAA	CAC	GGT	GAG	CTG	ATC	GAT	ATT	TTA	AAA	450
136	Asp	Lys	Gly	Ile	Ser	Glu	His	Gly	Glu	Leu	Ile	Asp	Ile	Leu	Lys	150

451	AGG CTT TCG CTG AAT ATT GAA GGG GTT CGA GAT CTC ACC CGA GAT	495
151	Arg Leu Ser Leu Asn Ile Glu Gly Val Arg Asp Leu Thr Arg Asp	165
496	GCG TGT ACC ATC TTT AAT GAT AAT TCC GAA GTA AAG GCT TTT GAG	540
166	Ala Cys Thr Ile Phe Asn Asp Asn Ser Glu Val Lys Ala Phe Glu	180
541	GAT GAA CTC CAA ACG AAT ATT GAG CTT AGA GCC TAC ACC GGT TCG	585
181	Asp Glu Leu Gln Thr Asn Ile Glu Leu Arg <u>Ala Tyr Thr Gly Ser</u>	195
586	GCA GAC ATA GGA AAT GTT CTC GCT ATT TTA AGA ACG CCT TAC AGG	630
196	<u>Ala Asp Ile Gly Asn Val Leu Ala Ile Leu Arg</u> Thr Pro Tyr Arg	210
631	ATT ATT AAA GAA GAA GAA GGT GAT AAC GAT GGA CTC GTT TCG GTT	675
211	<u>Ile Ile Lys Glu Glu Glu Gly Asp Asn Asp Gly Leu Val Ser Val</u>	225
676	AGC TCG GCA TTG TGG CAA AGG GCG AAA CAT ACT GGG ATT TGG AAG	720
226	<u>Ser Ser Ala Leu Trp Gln Arg</u> Ala Lys His Thr Gly Ile Trp Lys	240
721	GAT GCA GAC CAT CTA AAC GAG CTG GCC TGG TGG GAT TTT GCG CAA	765
241	Asp Ala Asp His Leu Asn Glu Leu Ala Trp Trp Asp Phe Ala Gln	255
766	GCC GGA ACG GAG GGG TTT TTG TCT TTG ACA AAG AGA ATT CAC CAT	810
256	Ala Gly Thr Glu Gly Phe Leu Ser Leu Thr Lys Arg Ile His His	270
811	AAG TAT CTG GAG ATT GCC AGG GAA CTT CCC GAA ATC TTC TAA	852
271	Lys Tyr Leu Glu Ile Ala Arg Glu Leu Pro Glu Ile Phe End'	

Espectros das massas trípticas da análise MALDI-ToF e localização dos peptídeos na sequência de aminoácidos de LipA. A relação das massas e sequência dos peptídeos estão na tabela inserida na figura. Os resíduos sublinhados e em negrito na sequência de LipA correspondem aos peptídeos trípticos identificados.

Diferentes procedimentos foram testados para obter LipA na fração solúvel, tais como: expressão da proteína sob baixas temperaturas (16-30 °C), variações na composição do tampão, força iônica (0,050-1 M de NaCl ou KCl), utilização de estirpes hospedeiras diferentes de *E. coli* (Origami (DE3)pLysS, Rosetta (DE3)pLysS), C41(DE3)pRARE) e sua co-expressão com chaperonas (GroEL/GroES). Porém, nas condições testadas, visando solubilização da proteína não foi possível obter LipA na forma solúvel.

Figura 18. Superexpressão da proteína LipA a partir do plasmídeo pET28b-LipA em *E. coli* BL21(λ DE3)pLysS.



Eletoforese em gel SDS-PAGE 12% (m/v) a partir do lisado de células após indução com 0,5 mM IPTG a 18 °C. As células foram lisadas em 50 mM de tampão fostato pH 7,0. Mw: marcador de peso molecular (Fermentas), Linha 1: fração celular solúvel, Linha 2: fração insolúvel. A seta indica a banda correspondente a proteína LipA. O gel foi corado com Coomassie brilliant blue R-250.

6.5 Caracterização enzimática de LipA

Diante dessa situação, foi decidido realizar os ensaios de atividade a partir do extrato de células de *E. coli* DH5 α /pUC-LipA, conforme descrito no Item 5.21.1 dos Materiais e Métodos. Como controle, extrato de *E. coli*

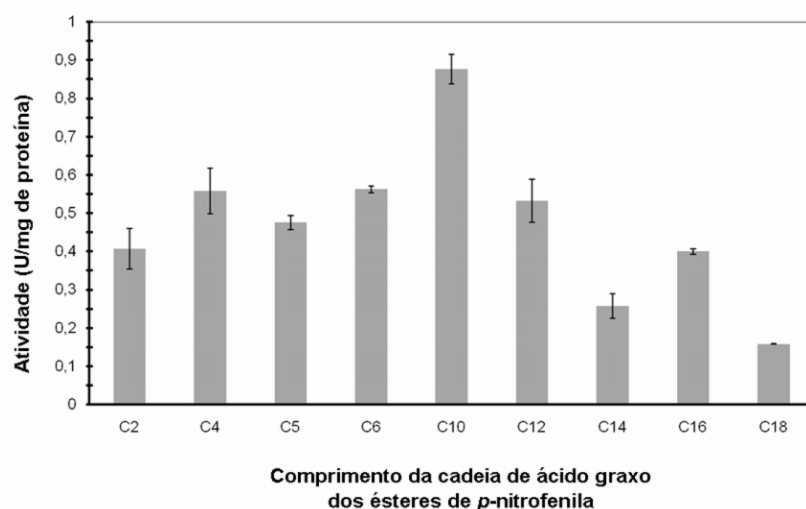
DH5α/pUC19 foi preparado e nenhuma atividade de lipase ou de esterase foi observada sob as condições utilizadas. A preferência e o modo de ação hidrolítica de uma enzima são importantes na classificação dentro da classe adequada, como lipase ou esterase. Como dito anteriormente, uma das definições mais aceitas para lipases, identifica esta classe de enzimas através da capacidade de hidrolisar substratos com cadeia acila maior que 10 carbonos; enquanto as esterases se restringem a cadeias acila de até 10 carbonos (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Inicialmente, LipA foi testada quanto a especificidade frente a vários ésteres de pNP com cadeias acila de diferentes tamanhos. Como mostrado na Figura 19, máxima atividade de hidrólise foi observada quando pNP-caprato (comprimento da cadeia carbônica: C10) foi utilizado como substrato (0,8 U mg/proteína). Um decréscimo de atividade foi observado com o aumento ou com a diminuição da cadeia carbônica a partir de pNP-caprato, mas com uma certa preferência para substratos de cadeia carbônica curta.

Como LipA apresentou atividade frente a substratos com cadeias de ácidos graxos maiores que 10 carbonos (exemplo: pNP-palmitato, C16: 0,4 U/mg de proteína), trata-se de uma lipase verdadeira e não uma esterase. O padrão de preferência por cadeia carbônica de tamanho médio é encontrado em algumas lipases do gênero *Bacillus* pertencentes às subfamílias I.4 e I.5 (EGGERT *et al.*, 2001; NTHANGENI *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2006). Com relação à ésteres de pNP, a lipase de *B. subtilis* apresentou preferência a pNP-caprilato (C8: 5,74 U/ mg de proteína – proteína purificada) (MA *et al.*, 2006). As lipases de *B. megaterium* e *Bacillus* sp. BP-6, de acordo com ensaios utilizando extrato

de células, apresentaram maiores valores frente a pNP-butirato (C4: 0,844 e 1,41 U/mg de proteína, respectivamente), com atividade decrescente conforme o aumento da cadeia carbônica (RUIZ *et al.*, 2002; RUIZ; JAVIER PASTOR; DIAZ, 2003).

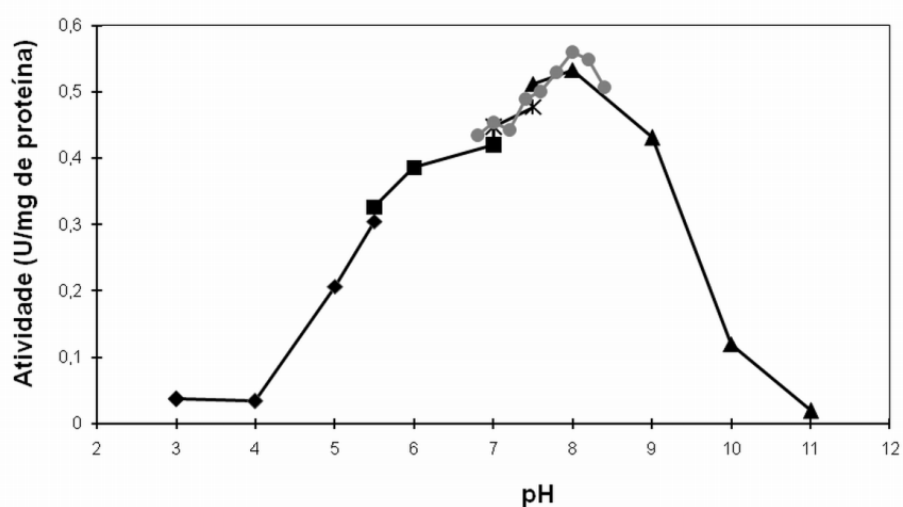
Figura 19. Especificidade ao substrato de LipA para ésteres de *p*-nitrofenila contendo cadeias de ácidos graxos de diferentes comprimentos.



A atividade lipase do extrato solúvel de células foi determinada a 30 °C com 50 mM Tris-HCl (pH 8,0). O comprimento da cadeia dos ésteres de pNP correspondem ao número de carbonos do ácido graxo. Os valores de atividade são as médias de ensaios em duplicata. Como controle foi utilizado extrato de *E. coli* DH5α/pUC19.

O efeito do pH na atividade de LipA foi determinado utilizando pNP-butirato como substrato e diferentes tampões na faixa de pH entre 3,0 a 11,0 (Figura 20). LipA teve atividade máxima no pH 8,0 com tampão 50 mM Tris-HCl (0,56U mg/proteína) ou 50 mM glicina/NaOH (0,53U mg/proteína). Uma característica interessante foi que a enzima apresentou atividade significativa dentro de uma faixa de pH de 7,0 a 9,0.

Figura 20. Efeito do pH na atividade de LipA.



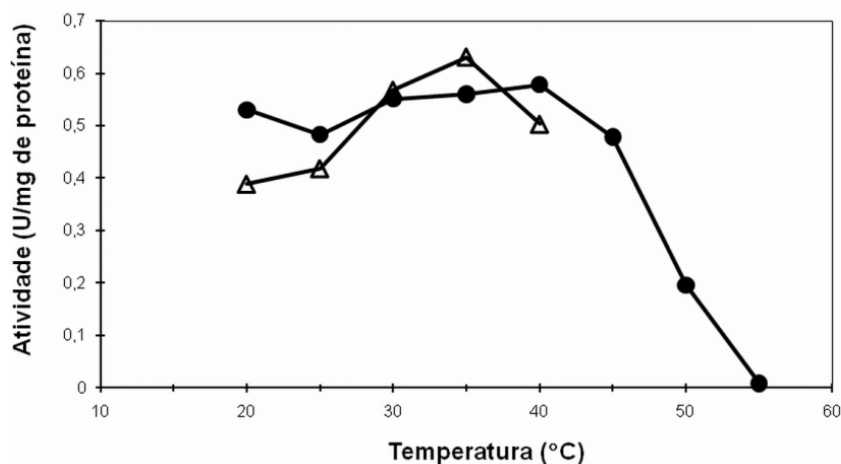
A atividade enzimática foi determinada para cada pH a 30 °C utilizando pNP-butirato como substrato. As soluções tampões foram: pH 3,0-5,5: 50 mM acetato/acetato de sódio (♦); pH 5,5-7,0: 50 mM MES (■); pH 7,0-7,5: 50 mM HEPES (×); pH 7,5-11,0: 50 mM glicina/NaOH (▲); pH 6,8-8,4: 50 mM Tris-HCl (●). Os valores de atividade são as médias de ensaios em duplicata.

O efeito da temperatura sobre a atividade de LipA foi determinada também com pNP-butirato como substrato em pH 8,0, na faixa de temperatura de 20 °C a 40 °C (Figura 21). LipA apresentou máxima atividade a 35 °C. Em baixas temperaturas (20 °C), LipA continuou tendo 61% de sua máxima atividade, porém em temperaturas acima de 35 °C já é possível perceber um decréscimo na atividade.

Para examinar a estabilidade térmica, o extrato bruto de células foi incubado durante 30 min sob temperaturas variando entre 20 °C a 55 °C, seguido de determinação da atividade residual a 30 °C. A enzima reteve 82-95% da sua atividade máxima após incubação entre 20 °C a 45 °C. Porém, a estabilidade da enzima diminuiu rapidamente quando a temperatura atingiu valores acima de 45 °C. Nenhuma atividade residual foi recuperada após 30 min a 55 °C (Figura 21).

A especificidade das lipases depende de propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e fatores que afetam a ligação da enzima com o substrato (JENSEN, 1983). Lipases microbianas podem ser divididas em três categorias baseadas na especificidade ao substrato: lipases não específicas (atuam aleatoriamente na molécula do triglicerídeo resultando na sua hidrólise completa em glicerol e ácido graxo), lipases sítio-específicas (hidrolisam somente ligações éster primárias, ex. nos átomos C1 e C3 do glicerol), e lipases com especificidade por ácidos-graxos (com preferência a determinados tipos de ácidos graxos) (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004).

Figura 21. Efeito da temperatura na atividade (Δ) e estabilidade (\bullet) de LipA.



A atividade enzimática foi determinada em cada temperatura de acordo com o ensaio padrão utilizando pNP-butirato e tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0). O efeito da temperatura na estabilidade de LipA foi determinada pela pré-incubação do extrato de células em tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) durante 30 min nas temperaturas de 20-55 °C e posterior determinação da atividade remanescente. Os valores de atividade são referentes aos ensaios em duplicata.

LipA pertence ao terceiro grupo de lipases com preferência para ácidos graxos de cadeia curta (C2-C6) ou média (C8-C12). Esse padrão ocorre também nas lipases de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Aeromonas hydrophila* (DARTOIS *et al.*, 1992; ANGUITA; RODRIGUEZ APARICIO; NAHARRO, 1993; SCHMIDT-DANNERT;

RUA; SCHMID, 1997; REETZ; JAEGER, 1998; EGGERT *et al.*, 2001; NTHANGENI *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2006).

Lipases bacterianas geralmente possuem temperatura máxima na faixa de 30 °C-60 °C e um pH ótimo neutro ou alcalino, mantendo estabilidade numa ampla faixa de pH (DARTOIS *et al.*, 1992; SCHMIDT-DANNERT; RUA; SCHMID, 1997; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). LipA manteve sua atividade em amplas faixas de temperatura e também de pH, características interessantes para utilização biotecnológica dessa enzima.

O presente estudo teve o objetivo de acessar o potencial enzimático de genomas de bactérias que habitam o solo de um manguezal preservado. Através da abordagem metagenômica foi possível o isolamento de uma nova lipase que possui baixa similaridade com lipases conhecidas. Isso confirma a abordagem metagenômica é capaz de acessar genes e enzimas não conhecidas ou exploradas. Também mostra que o manguezal, em particular seu sedimento, pode servir como fonte para a triagem de novos biocatalizadores.

7. CONCLUSÕES

- Uma biblioteca metagenômica do mangue foi construída com DNA isolado a partir do solo de mangue,
- Um gene codificando para uma nova lipase (LipA) foi identificado através da triagem funcional da biblioteca metagenômica,
- A sequência do gene *lipA* foi determinada, e os resultados mostram uma baixa similaridade com lipases de microrganismos conhecidos depositadas no banco de dados,
- LipA indica ser, juntamente com a lipase com número de acesso ACJ13070, membro de uma nova subfamília dentro da família I das lipases verdadeiras,
- LipA possui preferência para substratos de *p*-nitrofenol de cadeia média e curta, com máxima atividade frente a *p*-nitrofenol caprato (C10),
- LipA possui um pH ótimo de 8 e temperatura ótima de 35 °C.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAKVIK, T.; DEGNE, K. F.; DAHLSTRUD, R.; SCHMIDT, F.; DAM, R.; YU, L.; VOLKER, U.; ELLINGSEN, T. E.; VALLA, S. A plasmid RK2-based broad-host-range cloning vector useful for transfer of metagenomic libraries to a variety of bacterial species. **FEMS Microbiol Lett**, v. 296, p. 149-58, 2009.
- AL-SAYED, H. A.; GHANEM, E. H.; SALEH, K. M. Bacterial community and some physico-chemical characteristics in a subtropical mangrove environment in Bahrain. **Mar Pollut Bull**, v. 50, p. 147-55, 2005.
- ALONGI, D. M. The role of bacteria in nutrient recycling in tropical mangrove and other coastal benthic ecosystems. **Hydrobiologia**, v. 285, p. 19-32, 1994.
- ALONGI, D. M.; CHRISTOFFERSEN, P.; TIRENDI, F. The influence of forest type on microbial nutrient relationship in tropical mangrove sediments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 171, p. 201-223, 1993.
- ALTENBUCHNER, J.; VIELL, P.; PELLETIER, I. Positive selection vectors based on palindromic DNA sequences. **Methods Enzymol**, v. 216, p. 457-66, 1992.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol Rev**, v. 59, p. 143-69, 1995.
- ANGUITA, J.; RODRIGUEZ APARICIO, L. B.; NAHARRO, G. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, p. 2411-7, 1993.
- ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochem J**, v. 343, p. 177-83, 1999.
- ARRIGO, K. R. Marine microorganisms and global nutrient cycles. **Nature**, v. 437, p. 349-55, 2005.
- BACHOON, D. S.; OTERO, E.; HODSON, R. E. Effects of humic substances on fluorometric DNA quantification and DNA hybridization. **J Microbiol Methods**, v. 47, p. 73-82, 2001.
- BANKIER, A.T.; WESTON, K.M.; BARREL, B.G. Random cloning and sequencing by the M13/dideoxynucleotide chain termination method. **Meth Enzymol**, New York, v. 155, p. 51-93, 1987.
- BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUG-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; ET AL. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767-70, 1990.

BRADY, S. F.; CHAO, C. J.; HANDELSMAN, J.; CLARDY, J. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. **Org Lett**, v. 3, p. 1981-1984, 2001.

BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, G. G.; LAWSON, D. M.; TURKENBURG, J. P.; BJORKLING, F.; HUGE-JENSEN, B.; PATKAR, S. A.; THIM, L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, p. 491-4, 1991.

BULL, A. T.; BUNCH, A. W.; ROBINSON, G. K. Biocatalysts for clean industrial products and processes. **Curr Opin Microbiol**, v. 2, p. 246-51, 1999.

BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annu Rev Microbiol**, v. 46, p. 219-52, 1992.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, p. 573-606, 2000.

BYERS, C.; MILLS, E.L.; STUART, P.L. A comparison of methods of determining organic carbon in marine sediments, with suggestions for standard methods. **Hydrob**, v.58, no.1, p. 43-47, 1978.

CHAHINIAN, H.; NINI, L.; BOITARD, E.; DUBES, J. P.; COMEAU, L. C.; SARDA, L. Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG. **Lipids**, v. 37, p. 653-62, 2002.

CHENNA, R.; SUGAWARA, H.; KOIKE, T.; LOPEZ, R.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G.; THOMPSON, J. D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Res**, v. 31, p. 3497-500, 2003.

COTTRELL, M. T.; MOORE, J. A.; KIRCHMAN, D. L. Chitinases from uncultured marine microorganisms. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, p. 2553-2557, 1999.

COURTOIS, S.; CAPPELLANO, C. M.; BALL, M.; FRANCOU, F. X.; NORMAND, P.; HELYNCK, G.; MARTINEZ, A.; KOLVEK, S. J.; HOPKE, J.; OSBURNE, M. S.; AUGUST, P. R.; NALIN, R.; GUERINEAU, M.; JEANNIN, P.; SIMONET, P.; PERNODET, J. L. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 49-55, 2003.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. Microbiology: Exploring microbial diversity - a vast below. **Science**, v. 309, p. 1331-3, 2005.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. **Curr Opin Microbiol**, v. 7, p. 221-226, 2004.

CURTIS, T. P.; SLOAN, W. T.; SCANNELL, J. W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 10494-10499, 2002.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, p. 470-478, 2005.

DARTOIS, V.; BAULARD, A.; SCHANCK, K.; COLSON, C. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. **Biochim Biophys Acta**, v. 1131, p. 253-260, 1992.

DUJON, B.; SHERMAN, D.; FISCHER, G.; DURRENS, P.; CASAREGOLA, S.; LAFONTAINE, I.; DE MONTIGNY, J.; MARCK, C.; NEUEGLISE, C.; TALLA, E.; GOFFARD, N.; FRANGEUL, L.; AIGLE, M.; ANTHOUARD, V.; BABOUR, A.; BARBE, V.; BARNAY, S.; BLANCHIN, S.; BECKERICH, J.M.; BEYNE, E.; BLEKASTEN, C.; BOISRAMÉ, A.; BOYER, J.; CATTOLICO, L.; CONFANIERI, F.; DE DARUVAR, A.; DESPONS, L.; FABRE, E.; FAIRHEAD, C.; FERRY-DUMAZET, H. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v.430, p. 35-44, 2004.

EDGCOMB, V. P.; MCDONALD, J. H.; DEVEREUX, R.; SMITH, D. W. Estimation of bacterial cell numbers in humic acid-rich salt marsh sediments with probes directed to 16S ribosomal DNA. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, p. 1516-1523, 1999.

EGGERT, T.; VAN POUDEROYEN, G.; DIJKSTRA, B. W.; JAEGER, K. E. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. **FEBS Lett**, v. 502, p. 89-92, 2001.

EL-TARABILY, K. A. Total microbial activity and microbial composition of a mangrove sediment are reduced by oil pollution at a site in the Arabian Gulf. **Can J Microbiol**, v. 48, p. 176-182, 2002.

FERRER, M.; GOLYSHINA, O.; BELOQUI, A.; GOLYSHIN, P. N. Mining enzymes from extreme environments. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, p. 207-14, 2007.

GABOR, E. M.; DE VRIES, E. J.; JANSSEN, D. B. Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. **Environ Microbiol**, v. 6, p. 948-958, 2004.

GILLESPIE, D. E.; BRADY, S. F.; BETTERMANN, A. D.; CIANCOTTO, N. P.; LILES, M. R.; RONDON, M. R.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Isolation of antibiotics turbomycin a and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, p. 4301-4306, 2002.

GINOLHAC, A.; JARRIN, C.; GILLET, B.; ROBE, P.; PUJIC, P.; TUPHILE, K.; BERTRAND, H.; VOGEL, T. M.; PERRIERE, G.; SIMONET, P.; NALIN, R.

Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, p. 5522-7, 2004.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 59, p. 15-32, 2002.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p. 763-781, 2004.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 68, p. 669-685, 2004.

HARDEMAN, F.; SJOLING, S. Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 59, p. 524-534, 2007.

HASSINK, J. Relationship between the amount and the activity of the microbial biomass in Dutch grassland soils: Comparison of the fumigation-incubation method and the substrate-induced respiration method. **Soil Biol. Biochem** v. 25, p. 533-538, 1993.

HE, J.; XU, Z.; HUGHES J. Pre-lysis washing improves DNA extraction from a forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.2337-2341, 2005.

HEALY, F. G.; RAY, R. M.; ALDRICH, H. C.; WILKIE, A. C.; INGRAM, L. O.; SHANMUGAM, K. T. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 43, p. 667-674, 1995.

HENNE, A.; DANIEL, R.; SCHMITZ, R. A.; GOTTSCHALK, G. Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, p. 3901-3907, 1999.

HENNE, A.; SCHMITZ, R. A.; BOMEKE, M.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, p. 3113-3116, 2000.

HOLBEN, W. E.; JANSSON, J. K.; CHELM, B. K.; TIEDJE, J. M. DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community. **Appl Environ Microbiol**, v. 54, p. 703-711, 1988.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 265-278, 2001.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annu Rev Microbiol**, v. 53, p. 315-51, 1999.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Curr Opin Biotechnol**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol Rev**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **FEBS Lett**, v. 332, p. 143-149, 1993.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JENSEN, R. G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, v. 18, p. 650-657, 1983.

JOYNT, J.; BISCHOFF, M.; TURCO, R.; KONOPKA, A.; NAKATSU, C. H. Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons. **Microb Ecol**, v. 51, p. 209-219, 2006.

KIM, E. Y.; OH, K. H.; LEE, M. H.; KANG, C. H.; OH, T. K.; YOON, J. H. Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, p. 257-260, 2009.

KIM, S. J.; LEE, C. M.; HAN, B. R.; KIM, M. Y.; YEO, Y. S.; YOON, S. H.; KOO, B. S.; JUN, H. K. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. **FEMS Microbiol Lett**, v. 282, p. 44-51, 2008.

KIM, Y. J.; CHOI, G. S.; KIM, S. B.; YOON, G. S.; KIM, Y. S.; RYU, Y. W. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. **Protein Expr Purif**, v. 45, p. 315-323, 2006.

KNIETSCH, A.; BOWIEN, S.; WHITED, G.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 3048-3060, 2003a.

KNIETSCH, A.; WASCHKOWITZ, T.; BOWIEN, S.; HENNE, A.; DANIEL, R. Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 1408-1416, 2003b.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAMMLE, K.; ZIPPER, H.; BREUER, M.; HAUER, B.; BUTA, C.; BRUNNER, H.; RUPP, S. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. **J Biotechnol**, v. 127, p. 575-592, 2007.

LEE, K. C.; WEBB, R. I.; FUERST, J. A. The cell cycle of the planctomycete *Gemmata obscuriglobus* with respect to cell compartmentalization. **BMC Cell Biol**, v. 10, p. 4, 2009.

LEE, M. H.; LEE, C. H.; OH, T. K.; SONG, J. K.; YOON, J. H. Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, p. 7406-7409, 2006.

LI, Y.; WEXLER, M.; RICHARDSON, D. J.; BOND, P. L.; JOHNSTON, A. W. Screening a wide host-range, waste-water metagenomic library in tryptophan auxotrophs of *Rhizobium leguminosarum* and of *Escherichia coli* reveals different classes of cloned trp genes. **Environ Microbiol**, v. 7, p. 1927-1936, 2005.

LIESACK, W.; STACKEBRANDT, E. Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. **J Bacteriol**, v. 174, p. 5072-5078, 1992.

LILES, M. R.; MANSKE, B. F.; BINTRIM, S. B.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 2684-2691, 2003.

LIU, K.; WANG, J.; BU, D.; ZHAO, S.; MCSWEENEY, C.; YU, P.; LI, D. Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 385, p. 605-611, 2009.

LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK, J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. **Curr Opin Biotechnol**, v. 13, p. 572-577, 2002.

LYND, L. R.; LASER, M. S.; BRANSBY, D.; DALE, B. E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R.; HIMMEL, M.; KELLER, M.; MCMILLAN, J. D.; SHEEHAN, J.; WYMAN, C. E. How biotech can transform biofuels. **Nat Biotechnol**, v. 26, p. 169-172, 2008.

MA, J.; ZHANG, Z.; WANG, B.; KONG, X.; WANG, Y.; CAO, S.; FENG, Y. Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. **Protein Expr Purif**, v. 45, p. 22-29, 2006.

MARRS, B.; DELAGRAVE, S.; MURPHY, D. Novel approaches for discovering industrial enzymes. **Curr Opin Microbiol**, v. 2, p. 241-245, 1999.

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Curr Opin Struct Biol**, v. 9, p. 732-7, 1999.

NIELSEN, H.; ENGELBRECHT, J.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Eng**, v. 10, p. 1-6, 1997.

NIERMAN, W.C.; PAIN, A.; ANDERSON, M.J.; WORTMAN, J.R.; KIM, H.S.; ARROYO, J.; BERRIMAN, M.; ABE, K.; ARCHER, D.B.; BERMEJO, C.; BENNETT, J.; BOWYER, P.; CHEN, D.; COLLINS, M.; COULSEN, R.; DAVIES, R.; DYER, P.S.; FARMAN, M.; FEDOROVA, N.; FEDOROVA, N.; FELDBLYUM, T.V.; FISHER, R.; FOSKER, N.; FRASER, A.; GARCIA, J.L.; GARCIA, M.J.; GOBLE, A.; GOLDMAN, G.H.; GOMI, K.; GRIFFITH-JONES, S.; GWILLIAM, R.; HAAS, B.; HAAS, H.; HARRIS, D.; HORIUCHI, H.; HUANG, J.; HUMPHRAY, S.; JIMENEZ, J.; KELLER, N.; KHOURI, H.; KITAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; KONZACK, S.; KULKARNI, R.; KUMAGAI, T.; LAFON, A.; LATGE, J.P.; LI, W.; LORD, A.; LU, C.; MAJOROS, W.H.; MAY, G.S.; MILLER, B.L.; MOHAMOUD, Y.; MOLINA, M.; MONOD, M.; MOUYN, I.; MULLIGAN, S.; MURPHY, L.; O'NEIL, S.; PAULSEN, I.; PENALVA, M.A.; PERTEA, M.; PRICE, C.; PRITCHARD, B.L.; QUAIL, M.A.; RABINOWITSCH, E.; RAWLINS, N.; RAJANDREAM, M.A.; REICHARD, U.; RENAULD, H.; ROBSON, G.D.; RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; RODRIGUEZ-PENA, J.M.; RONNING, C.M.; RUTTER, S.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, M.; SANCHEZ-FERRERO, J.C.; SAUNDERS, D.; SEEGER, K.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAKEUCHI, M.; TEKAIA, F.; TURNER, G.; VAZQUEZ DE ALDANA, C.R.; WEIDMAN, J.; WHITE, O.; WOODWARD, J.; YU, J.H.; FRASER, C.; GALAGAN, J.E.; ASAI, K.; MACHIDA, M.; HALL, N.; BARELL, B.; DENNING, D.W. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v.438, p.1151-1156, 2005.

NOBLE, M. E.; CLEASBY, A.; JOHNSON, L. N.; EGMOND, M. R.; FRENKEN, L. G. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. **FEBS Lett**, v. 331, p. 123-128, 1993.

NTHANGENI, M. B.; PATTERTON, H.; VAN TONDER, A.; VERGEER, W. P.; LITTHAUER, D. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. **Enzyme Microb Technol**, v. 28, p. 705-712, 2001.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; ET AL. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Eng**, v. 5, p. 197-211, 1992.

OGRAM, A.; SAYLER, G.S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **J. Microbiol. Methods**, v.7, p. 57-66, 1987.

OLSEN, G. J.; LANE, D. J.; GIOVANNONI, S. J.; PACE, N. R.; STAHL, D. A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Annu Rev Microbiol**, v. 40, p. 337-365, 1986.

PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. **ASM News**, 51: 4-12, 1985.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 29, p. 119-131, 1999.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 31 (Pt 2), p. 135-152, 2000.

PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A.; GIBBS, R. A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clin Chem**, v. 55, p. 856-866, 2009.

REETZ, M. T.; JAEGER, K. E. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. **Chem Phys Lipids**, v. 93, p. 3-14, 1998.

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annu Rev Genet**, v. 38, p. 525-352, 2004.

ROBE, P.; NALIN, R.; CAPELLANO, C.; VOGEL, T.M.; SIMONET, P. Extraction of DNA from soil. **European Journal of soil Biology**, v. 39, p. 183-190, 2003.

ROBERTSON, D. E.; CHAPLIN, J. A.; DESANTIS, G.; PODAR, M.; MADDEN, M.; CHI, E.; RICHARDSON, T.; MILAN, A.; MILLER, M.; WEINER, D. P.; WONG, K.; MCQUAID, J.; FARWELL, B.; PRESTON, L. A.; TAN, X.; SNEAD, M. A.; KELLER, M.; MATHUR, E.; KRETZ, P. L.; BURK, M. J.; SHORT, J. M. Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, p. 2429-2436, 2004.

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, p. 2541-7, 2000.

RUIZ, C.; BLANCO, A.; JAVIER PASTOR, F.I.; DIAZ P. Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. **FEMS Microbiol Lett**, v.217, p.263-267.

RUIZ, C.; FALCOCCHIO, S.; XOXI, E.; PASTOR, F.I.J.; DIAZ, P.; SASO, L. Activation and inhibition of *Candida rugosa* and *Bacillus*-related lipases by

saturated fatty acids, evaluated by a new colorimetric microassay. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1672, p. 184-191, 2004.

RUIZ, C.; PASTOR, F.I.J.; DIAZ, P. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. BP-6 LipA, a ubiquitous lipase among mesophilic *Bacillus* species. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p.354-359.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULDON, A.R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *PNAS*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CINTRÓN-MOLERO, G; SOARES, M.L.G.; DE-ROSA, T. Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**. v. 3, p. 561-570, 2000.

SCHMIDT-DANNERT, C.; RUA, M. L.; SCHMID, R. D. Two novel lipases from thermophile *Bacillus thermocatenuatus*: screening, purification, cloning, overexpression, and properties. **Methods Enzymol**, v. 284, p. 194-220, 1997.

SCHMIDT, T. M.; DELONG, E. F.; PACE, N. R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **J Bacteriol**, v. 173, p. 4371-4378, 1991.

SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. **Methods Enzymol**, v. 284, p. 85-107, 1997.

SCHULZ, T.; PLEISS, J.; SCHMID, R. D. Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: a quantitative model. **Protein Sci**, v. 9, p. 1053-1062, 2000.

SO, C. M.; YOUNG, L. Y. Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, p. 2969-2976, 1999.

SPALDING, M.D.; BLASCO, F.; FIELD, C.D. World Mangrove Atlas. **International Society for Mangrove Ecosystems**, Okinawa, Japan. 178 p.

STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiol Lett**, v. 247, p. 105-111, 2005.

STEFFAN, R. J.; GOKSOYR, J.; BEJ, A. K.; ATLAS, R. M. Recovery of DNA from soils and sediments. **Appl Environ Microbiol**, v. 54, p. 2908-15, 1988.

STEIN, J. L.; MARSH, T. L.; WU, K. Y.; SHIZUYA, H.; DELONG, E. F. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. **J Bacteriol**, v. 178, p. 591-599, 1996.

SUGUIO, K. Introdução à sedimentologia. Ed. Edgard Blucher Ltda. EDUSP. 317, 1973.

TEBBE, C. C.; VAHJEN, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. **Appl Environ Microbiol**, v. 59, p. 2657-2665, 1993.

TORSVIK, V.L. Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.12, p.15-21, 1980.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, p. 782-787, 1990.

TORSVIK, V.; SALTE, K.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, p. 776-81, 1990.

TSAL, Y. L.; OLSON, B. H. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. **Appl Environ Microbiol**, v. 58, p. 754-757, 1992.

TUOHY, K. M.; GOUGOULIAS, C.; SHEN, Q.; WALTON, G.; FAVA, F.; RAMNANI, P. Studying the human gut microbiota in the trans-omics era--focus on metagenomics and metabonomics. **Curr Pharm Des**, v. 15, p. 1415-1427, 2009.

TYSON, G.W.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ, P.; ALLEN, E.E.; RAM, R.J.; RICHARDSON, P.M.; SOLOVYEV, V.V.; RUBIN, E.M.; ROKHSAR, D.S.; BANFIELD, J.F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, v. 428, p. 37-43, 2004.

UPPENBERG, J.; PATKAR, S.; BERGFORS, T.; JONES, T. A. Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. **J Mol Biol**, v. 235, p. 790-792, 1994.

VAN DEN BERG, M.A.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; BADGER, J.H.; DARAN, J.M.; DRIESSEN, A.J.; GARCIA-ESTRADA, C.; FEDOROVA, N.D.; HARRIS, D.M.; HEIJNE, W.H.; JOARDAR, V.; KIEL, J.A.; KOVALCHUK, A.; MARTIN, J.F.; NIERMAN, W.C.; NIJLAND, J.G.; PRONK, J.T.; ROUBOS, J.A.; VAN DER KLEI, I.J.; VAN PEIJ, N.N.; VEENHUIS, M.; VON DOHREN, H.; WAGNER, C.; WORTMAN, J.; BOVENBERG, R.A. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. **Nat Biotechnol**, v.26, p.1161-1168, 2008.

VAN ELSAS, J. D.; SPEKSNIJDER, A. J.; VAN OVERBEEK, L. S. A procedure for the metagenomics exploration of disease-suppressive soils. **J Microbiol Methods**, v. 75, p. 515-522, 2008.

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J. F.; HALPERN, A. L.; RUSCH, D.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K. E.; NELSON,

W.; FOUTS, D. E.; LEVY, S.; KNAP, A. H.; LOMAS, M. W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKOCH, C.; ROGERS, Y. H.; SMITH, H. O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v. 304, p. 66-74, 2004.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 32-38, 1997.

VOGET, S.; LEGEWIE, C.; UESBECK, A.; RAASCH, C.; JAEGER, K. E.; STREIT, W. R. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 6235-6242, 2003.

WANG, J.; GEBRE, A. K.; ANDERSON, R. A.; PARKS, J. S. Cloning and in vitro expression of rat lecithin:cholesterol acyltransferase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1346, p. 207-211, 1997.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Proteomics in Practice: A laboratory Manual of Proteome Analysis. In: Gel digestion (Westermeier R and Naven T, eds.). Wiley-VCH, Weinheim, 261, 2002.

WINKLER, F. K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, p. 771-774, 1990.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiol Rev**, v. 51, p. 221-71, 1987.

YUN, J.; KANG, S.; PARK, S.; YOON, H.; KIM, M. J.; HEU, S.; RYU, S. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, p. 7229-7235, 2004.

ZHOU, J.; BRUNS, M. A.; TIEDJE, J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p. 316-322, 1996.

9. APÊNDICE

Apêndice 1. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos das ORF's que compreendem o inserto do plasmídeo pUC-LipA.

TTTGCTAAGGCTAACAACTTTTCTCGGTTGTGCGGATCGGACACCCTGTCAGAACACGTCGTCGATAACG
AGACTCGAGAATCCAAACCGGACATTTTTGAAAGGAGGTATAAGAA

1	TTG	AAA	ACA	AAA	AAA	ACT	TAT	CCA	ATT	ATT	CTT	GCT	CAC	GGT	ATT	45
1	Leu	Lys	Thr	Lys	Lys	Thr	Tyr	Pro	Ile	Ile	Leu	Ala	His	Gly	Ile	15
46	GTC	AGG	TTC	GAT	GCG	GGC	TGG	AAT	GAA	CTT	ATC	CAG	CTG	GAT	AAC	90
16	Val	Arg	Phe	Asp	Ala	Gly	Trp	Asn	Glu	Leu	Ile	Gln	Leu	Asp	Asn	30
91	CAG	GAT	GAT	CCC	TTT	TTG	GAT	ATG	TTC	CAT	TAT	TTT	CGT	GGT	ATT	135
31	Gln	Asp	Asp	Pro	Phe	Leu	Asp	Met	Phe	His	Tyr	Phe	Arg	Gly	Ile	45
136	CGG	ACG	ATG	CTT	CTT	AAC	CGT	GGT	TTC	TCA	GTT	TAT	CAT	TCG	AGT	180
46	Arg	Thr	Met	Leu	Leu	Asn	Arg	Gly	Phe	Ser	Val	Tyr	His	Ser	Ser	60
181	GTC	CCT	TGG	GCC	GAT	GAA	GTG	GAT	AGA	CGC	GCC	GAG	CAA	TTA	AGA	225
61	Val	Pro	Trp	Ala	Asp	Glu	Val	Asp	Arg	Arg	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	75
226	AAG	AAC	GTG	CGG	AAC	GTG	CTC	GAA	CAG	ACG	GGT	GCT	GAA	AAA	GTA	270
76	Lys	Asn	Val	Arg	Asn	Val	Leu	Glu	Gln	Thr	Gly	Ala	Glu	Lys	Val	90
271	AAC	ATC	ATT	GCG	CAC	AGT	ATG	GGG	GGG	CTT	GAC	GCG	CGT	CAT	ATG	315
91	Asn	Ile	Ile	Ala	His	Ser	Met	Gly	Gly	Leu	Asp	Ala	Arg	His	Met	105
316	CTT	TTT	AAT	GAC	CGA	AAC	AAA	GGC	AAG	ATT	CAC	GAA	AAA	ATA	GCC	360
106	Leu	Phe	Asn	Asp	Arg	Asn	Lys	Gly	Lys	Ile	His	Glu	Lys	Ile	Ala	120
361	TCT	CTG	ACC	ACC	ATT	GGG	ACA	CCT	CAC	CTT	GGT	ACC	TCA	TTT	GCG	405
121	Ser	Leu	Thr	Thr	Ile	Gly	Thr	Pro	His	Leu	Gly	Thr	Ser	Phe	Ala	135
406	GAC	AAG	GGG	ATT	AGT	GAA	CAC	GGT	GAG	CTG	ATC	GAT	ATT	TTA	AAA	450
136	Asp	Lys	Gly	Ile	Ser	Glu	His	Gly	Glu	Leu	Ile	Asp	Ile	Leu	Lys	150
451	AGG	CTT	TCG	CTG	AAT	ATT	GAA	GGG	GTT	CGA	GAT	CTC	ACC	CGA	GAT	495
151	Arg	Leu	Ser	Leu	Asn	Ile	Glu	Gly	Val	Arg	Asp	Leu	Thr	Arg	Asp	165
496	GCG	TGT	ACC	ATC	TTT	AAT	GAT	AAT	TCC	GAA	GTA	AAG	GCT	TTT	GAG	540
166	Ala	Cys	Thr	Ile	Phe	Asn	Asp	Asn	Ser	Glu	Val	Lys	Ala	Phe	Glu	180
541	GAT	GAA	CTC	CAA	ACG	AAT	ATT	GAG	CTT	AGA	GCC	TAC	ACC	GGT	TCG	585
181	Asp	Glu	Leu	Gln	Thr	Asn	Ile	Glu	Leu	Arg	Ala	Tyr	Thr	Gly	Ser	195
586	GCA	GAC	ATA	GGA	AAT	GTT	CTC	GCT	ATT	TTA	AGA	ACG	CCT	TAC	AGG	630
196	Ala	Asp	Ile	Gly	Asn	Val	Leu	Ala	Ile	Leu	Arg	Thr	Pro	Tyr	Arg	210
631	ATT	ATT	AAA	GAA	GAA	GAA	GGT	GAT	AAC	GAT	GGA	CTC	GTT	TCG	GTT	675
211	Ile	Ile	Lys	Glu	Glu	Glu	Gly	Asp	Asn	Asp	Gly	Leu	Val	Ser	Val	225
676	AGC	TCG	GCA	TTG	TGG	CAA	AGG	GCG	AAA	CAT	ACT	GGG	ATT	TGG	AAG	720
226	Ser	Ser	Ala	Leu	Trp	Gln	Arg	Ala	Lys	His	Thr	Gly	Ile	Trp	Lys	240
721	GAT	GCA	GAC	CAT	CTA	AAC	GAG	CTG	GCC	TGG	TGG	GAT	TTT	GCG	CAA	765
241	Asp	Ala	Asp	His	Leu	Asn	Glu	Leu	Ala	Trp	Trp	Asp	Phe	Ala	Gln	255

766	GCC GGA ACG GAG GGG TTT TTG TCT TTG ACA AAG AGA ATT CAC CAT	810
256	Ala Gly Thr Glu Gly Phe Leu Ser Leu Thr Lys Arg Ile His His	270
811	AAG TAT CTG GAG ATT GCC AGG GAA CTT CCC GAA ATC TTC TAA	852
271	Lys Tyr Leu Glu Ile Ala Arg Glu Leu Pro Glu Ile Phe End	

TCAAACCTTAGAAATCCTGGTCCTGTGGGCTTCCGGCTCGTATTCCCTAACGGCTCGGAGAGCCGGGTCAGA
 GATAATCGGCGATGCCATAAGAGATTAATCGAAAGAGGTTGAGCCGGTTTAGCCAGTTGTCCGGTTTTGC
 CCGTTTCGTCTGTTTTCCGTCGGCCTCGCTGAAGCGTAAAGCTGTTATATCCAAGCAAGAGAAAAACCATGC
 ATCAAGTAATTATTAACTTAATATAGGAAAATCAGCTTTTTATGTATTCCGATAACCCGTCAATCCGCC
 CAAGGCGGACTTAACGGGCTAACCTGTCTCAAAAATATTTCGGTGCTAGACCCCTTTTCGGGGGCTAGACA
 AAGCCGGACCCTCTGGACTCGGATTTTTACAATTGAGTTCTATTTACGACAACATCTAAACTCTAACAGT
 TAAAGGAGGAACCTACG

1	ATG TCA AAA ATA ACA ATT AAT GGT GTT ACA GTC GAT CCG TTG GCA	45
1	Met Ser Lys Ile Thr Ile Asn Gly Val Thr Val Asp Pro Leu Ala	15
46	CAG GGC CCA GCC CTC GCC GCG GCA AAT CTA CTT TCA GCC GAT GCC	90
16	Gln Gly Pro Ala Leu Ala Ala Ala Asn Leu Leu Ser Ala Asp Ala	30
91	ACC GAC TCC GAC TAC ATC CTG ATT CAG ACG GCG CAA CCG CTT AGC	135
31	Thr Asp Ser Asp Tyr Ile Leu Ile Gln Thr Ala Gln Pro Leu Ser	45
136	AAG GAT ATG AAA AGT GAG TTG ACG AAC ATG GGT GTC GTG ATC CTG	180
46	Lys Asp Met Lys Ser Glu Leu Thr Asn Met Gly Val Val Ile Leu	60
181	GAA TAT GTA CCG GAT GAT ACC TAT CTG TGT AAT TAC ACG GGC ACG	225
61	Glu Tyr Val Pro Asp Asp Thr Tyr Leu Cys Asn Tyr Thr Gly Thr	75
226	GAT CTC GAC CAA ATT CGG TCG CTG GCT TAT GTC GAT TGG GCC GAC	270
76	Asp Leu Asp Gln Ile Arg Ser Leu Ala Tyr Val Asp Trp Ala Asp	90
271	ATC TAC ATG CAG GGA TTC AAG GTC GCC CCT TCT TTG ACG ACC AGA	315
91	Ile Tyr Met Gln Gly Phe Lys Val Ala Pro Ser Leu Thr Thr Arg	105
316	CCT GTC ACG GCA CCT GCC GGG GCA CGA GAT CTG CTG GGC GTA GCA	360
106	Pro Val Thr Ala Pro Ala Gly Ala Arg Asp Leu Leu Gly Val Ala	120
361	GCG GCC CCG GCA AGC AAT CTA AGT ACG GCC CCC AAG GTA GTC GAT	405
121	Ala Ala Pro Ala Ser Asn Leu Ser Thr Ala Pro Lys Val Val Asp	135
406	GTC GTC TTC CAT TCG AAC GTC GAT ACG CAA TCC ATT CGA GAC AAG	450
136	Val Val Phe His Ser Asn Val Asp Thr Gln Ser Ile Arg Asp Lys	150
451	CTG GCG GCA GCA GCC CAT CTT GAT CCA TCG GAT CTG AAG ATA ATG	495
151	Leu Ala Ala Ala Ala His Leu Asp Pro Ser Asp Leu Lys Ile Met	165
496	CCA CAC AAG ATG CGG CTC AAC GTA CAG ACC AAA TAC TTG AAC GCC	540
166	Pro His Lys Met Arg Leu Asn Val Gln Thr Lys Tyr Leu Asn Ala	180
541	CTC GCC GGC ATC GAT GAA GTG CGG CAT ATC GAG GAA GTG CTA CCG	585
181	Leu Ala Gly Ile Asp Glu Val Arg His Ile Glu Glu Val Leu Pro	195
586	ATG AAG CTC CAC AAT AAC ATT GCG CGT GAG ATC CTC AAC CTT GAG	630
196	Met Lys Leu His Asn Asn Ile Ala Arg Glu Ile Leu Asn Leu Glu	210
631	CCT CCA CCG CAT CCT GCC ACG CCC TTC GAA GGG CAA GGA CAG ACG	675
211	Pro Pro Pro His Pro Ala Thr Pro Phe Glu Gly Gln Gly Gln Thr	225
676	GTG GCT GTC GCC GAT ACC GGC TTC GAT AGG GGG TCG ACG ACG GAC	720
226	Val Ala Val Ala Asp Thr Gly Phe Asp Arg Gly Ser Thr Thr Asp	240

721	GTG	CAT	GAA	GCA	TTC	ACG	GGC	CGT	GTC	GCG	CGG	CTG	TAT	GCA	CTC	765
241	Val	His	Glu	Ala	Phe	Thr	Gly	Arg	Val	Ala	Arg	Leu	Tyr	Ala	Leu	255
766	GGG	CGA	GCG	AAT	GCC	AAT	GAC	CCG	GAC	GGG	CAT	GGC	ACC	CAC	GTT	810
256	Gly	Arg	Ala	Asn	Ala	Asn	Asp	Pro	Asp	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	270
811	GCC	GGG	TCA	GTC	CTT	GGA	GAT	GGC	GAC	TCG	TCC	GCG	CTG	GGC	CAT	855
271	Ala	Gly	Ser	Val	Leu	Gly	Asp	Gly	Asp	Ser	Ser	Ala	Leu	Gly	His	285
856	AAT	ATC	AGG	GGC	ACG	GCG	CCG	GCG	GCT	CGG	TTG	GTT	CTG	CAG	TCC	900
286	Asn	Ile	Arg	Gly	Thr	Ala	Pro	Ala	Ala	Arg	Leu	Val	Leu	Gln	Ser	300
901	GTC	TTA	GAC	AGC	AAT	GGT	GGG	CTC	GGT	GGA	TTG	CCC	GAT	GAT	TTG	945
301	Val	Leu	Asp	Ser	Asn	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Leu	Pro	Asp	Asp	Leu	315
946	AAC	GAT	CTG	TTC	CAG	CCA	CCT	TAT	GAT	GAC	GAT	GGC	GTA	CGC	ATT	990
316	Asn	Asp	Leu	Phe	Gln	Pro	Pro	Tyr	Asp	Asp	Asp	Gly	Val	Arg	Ile	330
991	CAC	ACA	AAT	TCA	TGG	GGC	AGT	ACC	CTG	GGT	GAT	GGG	CGC	TAC	AAT	1035
331	His	Thr	Asn	Ser	Trp	Gly	Ser	Thr	Leu	Gly	Asp	Gly	Arg	Tyr	Asn	345
1036	TCA	AAT	TCA	AGA	GAG	GTC	GAC	GAA	TTT	GTC	TGG	GAA	CAC	CGT	GAC	1080
346	Ser	Asn	Ser	Arg	Glu	Val	Asp	Glu	Phe	Val	Trp	Glu	His	Arg	Asp	360
1081	GGT	GTT	ATT	TGT	TTT	TCT	GCC	GGT	AAC	GAA	GGC	GTG	GAC	CAC	ACC	1125
361	Gly	Val	Ile	Cys	Phe	Ser	Ala	Gly	Asn	Glu	Gly	Val	Asp	His	Thr	375
1126	TCT	GAA	TCC	GGC	GTA	ATT	GAT	CCA	AGG	TCG	ATT	ACG	CCT	CCG	GCG	1170
376	Ser	Glu	Ser	Gly	Val	Ile	Asp	Pro	Arg	Ser	Ile	Thr	Pro	Pro	Ala	390
1171	ACC	GCT	AAG	AAT	TGT	ATC	ACG	ATT	GGC	GCT	ACG	GAA	AAC	GAC	CGG	1215
391	Thr	Ala	Lys	Asn	Cys	Ile	Thr	Ile	Gly	Ala	Thr	Glu	Asn	Asp	Arg	405
1216	CCG	AAT	TTC	ATT	GTG	ACC	TAC	CAG	CAA	GGA	TTC	GGT	GCC	GCT	GAT	1260
406	Pro	Asn	Phe	Ile	Val	Thr	Tyr	Gln	Gln	Gly	Phe	Gly	Ala	Ala	Asp	420
1261	TTT	CCA	GCG	AAT	CCC	ATT	GCG	TCT	GAC	CGC	ATG	GCA	AAT	AAT	CCC	1305
421	Phe	Pro	Ala	Asn	Pro	Ile	Ala	Ser	Asp	Arg	Met	Ala	Asn	Asn	Pro	435
1306	GAC	GGT	ATG	GTG	GCG	TTC	AGC	AGC	CGC	GGC	CCT	ACC	ACC	GAT	GGA	1350
436	Asp	Gly	Met	Val	Ala	Phe	Ser	Ser	Arg	Gly	Pro	Thr	Thr	Asp	Gly	450
1351	CGC	ATA	AAA	CCG	GAT	GTG	GTG	GCA	CCC	GGC	AGT	TTC	ATC	TTA	TCA	1395
451	Arg	Ile	Lys	Pro	Asp	Val	Val	Ala	Pro	Gly	Ser	Phe	Ile	Leu	Ser	465
1396	ACG	CGA	TCA	CGG	GAC	ACG	AGC	GAT	ACC	GGC	TGG	GCG	GAG	TCC	GCA	1440
466	Thr	Arg	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Asp	Thr	Gly	Trp	Ala	Glu	Ser	Ala	480
1441	GAT	CAA	CTG	TAC	TTT	TTT	ATG	GGT	GGA	ACG	AGC	ATG	GCC	ACG	CCG	1485
481	Asp	Gln	Leu	Tyr	Phe	Phe	Met	Gly	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Pro	495
1486	CTG	GTT	GCC	GGT	TGC	GCC	GCC	GTG	GTT	CGG	CAA	TAC	CTA	GCG	ACG	1530
496	Leu	Val	Ala	Gly	Cys	Ala	Ala	Val	Val	Arg	Gln	Tyr	Leu	Ala	Thr	510
1531	GCA	CAC	CAG	ATC	ACC	ACT	CCC	AGC	GCG	GCC	CTG	GTC	AAG	GCC	ATG	1575
511	Ala	His	Gln	Ile	Thr	Thr	Pro	Ser	Ala	Ala	Leu	Val	Lys	Ala	Met	525
1576	TTG	ATT	AAC	GGC	GCA	CAA	GAT	GTG	GCC	GGG	CAA	TAT	GTG	CCT	TCG	1620
526	Leu	Ile	Asn	Gly	Ala	Gln	Asp	Val	Ala	Gly	Gln	Tyr	Val	Pro	Ser	540
1621	GAG	GCG	GGC	AGC	ATC	CCA	AAC	AAT	TCC	GAA	GGC	TTC	GGC	CGG	GTT	1665
541	Glu	Ala	Gly	Ser	Ile	Pro	Asn	Asn	Ser	Glu	Gly	Phe	Gly	Arg	Val	555
1666	GAT	ATG	GCA	GCT	ACC	TTA	AGC	GAG	TCG	ATC	CAA	TTG	CGA	GAT	GAG	1710
556	Asp	Met	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	Glu	Ser	Ile	Gln	Leu	Arg	Asp	Glu	570

1711	GCC	ACT	GCG	CTC	GAT	GCA	GGT	GAC	GAA	GAG	ACC	ACC	ACC	GTC	ACC	1755
571	Ala	Thr	Ala	Leu	Asp	Ala	Gly	Asp	Glu	Glu	Thr	Thr	Thr	Val	Thr	585
1756	GTC	GGT	GAG	GGT	GCT	TCG	CTC	AAG	GTA	ACG	CTC	GTG	TGG	ACC	GAC	1800
586	Val	Gly	Glu	Gly	Ala	Ser	Leu	Lys	Val	Thr	Leu	Val	Trp	Thr	Asp	600
1801	AGA	CCG	GGC	TCC	ACC	TTG	CAA	AAC	GAT	CTC	GAC	CTG	ATT	GTC	CGG	1845
601	Arg	Pro	Gly	Ser	Thr	Leu	Gln	Asn	Asp	Leu	Asp	Leu	Ile	Val	Arg	615
1846	ACC	TCG	GGC	GGC	CAG	GAA	CGT	CAC	GGC	AAC	GTT	GCG	CCG	AAT	TCA	1890
616	Thr	Ser	Gly	Gly	Gln	Glu	Arg	His	Gly	Asn	Val	Ala	Pro	Asn	Ser	630
1891	ACG	GCA	TTT	GAT	CGC	GAC	AAT	AAC	GTC	GAG	CAA	GTC	GTC	TGG	GAC	1935
631	Thr	Ala	Phe	Asp	Arg	Asp	Asn	Asn	Val	Glu	Gln	Val	Val	Trp	Asp	645
1936	AAC	CTG	CCT	GCA	GGA	GAT	GTC	GAT	ATT	ATC	GTT	CGT	GCC	CAC	CGC	1980
646	Asn	Leu	Pro	Ala	Gly	Asp	Val	Asp	Ile	Ile	Val	Arg	Ala	His	Arg	660
1981	ATA	CCA	TCG	TTC	GCT	CAG	TCC	TAC	GCG	TTG	GTG	ACA	CGC	ACC	GAA	2025
661	Ile	Pro	Ser	Phe	Ala	Gln	Ser	Tyr	Ala	Leu	Val	Thr	Arg	Thr	Glu	675
2026	GGG	GGC	AGC	CAA	CCG	CGA	CCG	CCA	GGG	GAT	TTG	GTG	ATT	AAC	GGA	2070
676	Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Arg	Pro	Pro	Gly	Asp	Leu	Val	Ile	Asn	Gly	690
2071	CCG	GAG	GTG	TTT	GGA	GAA	ATC	AAC	CCC	GCC	GGC	GAG	CAG	GAC	CTC	2115
691	Pro	Glu	Val	Phe	Gly	Glu	Ile	Asn	Pro	Ala	Gly	Glu	Gln	Asp	Leu	705
2116	TAT	ACG	CTT	AGC	GTG	ACC	ACC	GCA	GGA	AGG	TAT	ACG	ATT	GAC	ACC	2160
706	Tyr	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Thr	Ala	Gly	Arg	Tyr	Thr	Ile	Asp	Thr	720
2161	TCC	GGC	ACG	AAA	GAT	ACG	TTC	TTG	AGT	CTT	TTC	GGT	CCG	GAT	AGT	2205
721	Ser	Gly	Thr	Lys	Asp	Thr	Phe	Leu	Ser	Leu	Phe	Gly	Pro	Asp	Ser	735
2206	GAG	ACG	ACC	CTT	GTT	GCC	GCA	GAC	GAT	GAC	AGC	GGA	CCG	GGG	ACA	2250
736	Glu	Thr	Thr	Leu	Val	Ala	Ala	Asp	Asp	Asp	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	750
2251	TTG	TCG	TTA	CTG	GTG	CAG	GAT	TTG	GCA	GCC	GGC	ACT	TAT	TTA	CTC	2295
751	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Gln	Asp	Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Tyr	Leu	Leu	765
2296	CAG	GTC	CGC	CAT	TTT	AAT	CCG	ACC	GGC	AGT	GGC	CCC	TAT	GGA	ATC	2340
766	Gln	Val	Arg	His	Phe	Asn	Pro	Thr	Gly	Ser	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ile	780
2341	AAT	GTA	GTG	TCA	AAC	ACC	AAT	CCC	CCA	CCT	GTG	CAG	ATA	CAA	GTC	2385
781	Asn	Val	Val	Ser	Asn	Thr	Asn	Pro	Pro	Pro	Val	Gln	Ile	Gln	Val	795
2386	GAT	GGT	CCG	GAA	GTT	CAA	GGC	GAT	ATT	GGG	CAG	CCG	GGC	GAA	AGC	2430
796	Asp	Gly	Pro	Glu	Val	Gln	Gly	Asp	Ile	Gly	Gln	Pro	Gly	Glu	Ser	810
2431	GAT	CTG	TTC	ACC	TTT	AGT	GTG	GCT	ACG	GCA	GGC	GAG	CAT	GTT	ATC	2475
811	Asp	Leu	Phe	Thr	Phe	Ser	Val	Ala	Thr	Ala	Gly	Glu	His	Val	Ile	825
2476	GAA	ACA	TCA	GGT	TCA	ACT	GAT	ACG	TTC	CTC	GCC	CTG	TTT	GGG	CCG	2520
826	Glu	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asp	Thr	Phe	Leu	Ala	Leu	Phe	Gly	Pro	840
2521	AAC	AGT	GAT	GCC	GAT	CTC	ATT	GCC	CAA	GAC	CAT	GAT	AGT	GGG	CCT	2565
841	Asn	Ser	Asp	Ala	Asp	Leu	Ile	Ala	Gln	Asp	His	Asp	Ser	Gly	Pro	855
2566	GAT	TTG	CTG	TCT	CGC	CAT	TCA	GCA	AGT	TCT	GGC	AGT	CGG	CAC	CTA	2610
856	Asp	Leu	Leu	Ser	Arg	His	Ser	Ala	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg	His	Leu	870
2611	TTT	TGT	CAG	AAT	CAG	GCA	TTT	TAG	2634 CGCAG							
871	Phe	Cys	Gln	Asn	Gln	Ala	Phe	End								